Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

BEEINFLUSSUNG DER HEPATOCARCINOGENEN WIRKUNG VON DIÄTHYLNITROSAMIN BEI WISTAR–RATTEN DURCH SIMULTANE DDT–APPLIKATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Johann Schuster
aus Ellwangen
– 1978 –

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0028

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

BEEINFLUSSUNG DER HEPATOCARCINOGENEN WIRKUNG VON DIÄTHYLNITROSAMIN BEI WISTAR–RATTEN DURCH SIMULTANE DDT–APPLIKATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Johann Schuster
aus Ellwangen
– 1978 –

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Kunz (Prof. Dr. med. H. Remmer)
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Schaude

Herrn Professor Dr. H. REMMER danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Professor Dr. W. KUNZ und Herrn Akad. Oberrat Dr. M. BÜHLER danke ich für die intensive Betreuung bei Planung, Durchführung und Diskussion der Experimente sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Material und Versuchstiere	8
2.1.1.	Chemikalien, Substrate und Enzyme	8
2.1.2.	Tiere und Tierhaltung	9
2.1.3.	Applikation der Substanzen	9
2.2.	Histochemische Untersuchungen	10
2.2.1.	Organentnahme und Anfertigung von Gefrierschnitten	10
2.2.2.	ATPase Reaktion	10
2.2.3.	Färbung mit Kresylviolett	11
2.3.	Biochemische Untersuchungen	12
2.3.1.	Organentnahme und Mikrosomenpräparation	12
2.3.2.	Bestimmung von Protein	13
2.3.3.	Bestimmung von Cytochrom P450 und Cytochrom b_5	13
2.3.4.	Bestimmung der Nitroanisoldemethylierung	14
2.3.5.	Formaldehydbestimmung	14
2.3.6.	Bestimmung der Alkylierung	15
2.3.7.	Radioaktivitätsmessung	16
2.4.	Statistische Berechnungen	16
3.	ERGEBNISSE	17
3.1.	Theoretische Grundlagen zur quantitativen Analyse von Gewebestrukturen und ihre praktische Anwendung zur Bestimmung enzymdefekter Zellherde.	17

		Seite
3.1.1.	Planimetrie	18
3.1.1.1.	Okularplanimetrie	18
3.1.1.2.	Projektionsplanimetrie	19
3.1.2.	Integrationsverfahren	19
3.1.2.1.	Messung von Fläche und Volumen	20
3.1.2.2.	Messung der numerischen Dichte	20
3.1.2.3.	Integrationsplatte	21
3.1.2.4.	Manuell-optischer Bildanalysator	22
3.1.2.5.	Scanning-Verfahren	23
3.1.3.	Beurteilung der einzelnen Meßverfahren	23
3.2.	Tierexperimentelle Ergebnisse	25
3.2.1.	Versuchsaufbau	25
3.2.2.	Allgemeinverhalten und Körpergewicht	26
3.2.3.	Makroskopischer Organbefund	27
3.2.4.	Relatives Lebergewicht	28
3.3.	Quantitative Bestimmung von Zahl und Größe enzymdefekter Inseln	29
3.3.1.	Abhängigkeit von Zahl, Einzelgröße und Gesamtvolumen enzymdefekter Inseln von der DÄNA-Dosis	30
3.3.2.	Abhängigkeit von Zahl, Einzelgröße und Gesamtvolumen enzymdefekter Inseln von der Dauer des behandlungsfreien Intervalls	37
3.4.	Biochemische Ergebnisse	41
4.	DISKUSSION	47
4.1.	Kritik der angewandten Methode zur Beurteilung carcinogener Substanzwirkungen durch quantitative Bestimmung enzymdefekter Zellareale	49

Seite

4.2. Beeinflussung der durch DÄNA induzierten präneoplastischen Veränderungen durch DDT 52

4.3. Zahl und Volumen präneoplastischer Veränderungen unter isolierter DDT-Applikation 54

4.4. Zelluläre Veränderungen unter DDT-Behandlung 54

4.5. Einfluß von DDT auf das Wachstum transformierter Zellen 55

4.6. Beeinflussung des Carinogenmetabolismus durch DDT 56

5. ZUSAMMENFASSUNG 58

6. TABELLEN 61

7. LITERATURVERZEICHNIS 68

8. LEBENSLAUF

EINLEITUNG

DDT ist heute über die ganze Erdoberfläche verbreitet, da es nach Entdeckung seiner insektiziden Wirkung durch P. MILLER kritiklos seit 1943 zur Bekämpfung von Typhus, Malaria, Gelbfieber und anderen, von Insekten übertragenen Krankheiten eingesetzt wurde. Da es gegen physikalische und metereologische Einflüsse weitgehend unempfindlich ist, hat dies zur Folge, daß wir kontinuierlich 60 µg/die DDT und DDT-Metaboliten mit der Nahrung aufnehmen (U.S. Department, 1969). Nach Resorption werden DDT und seine Metaboliten im Fettgewebe gespeichert. Nach DURHAM (1969) betrug 1969 die DDT-Konzentration im Fettgewebe der Bevölkerung der BRD im mittel 2,3 ppm. DDT bleibt jedoch nicht unverändert im Körperfett liegen, sondern bildet ein Verteilungsgleichgewicht mit Konzentrationsverhältnis von 50 : 1 zwischen Fett und Blutplasma (BÜHLER). Dadurch wird DDT kontinuierlich der Leber zugeführt, wo es auf folgenden Abbauwegen durch das mikrosomale Monooxygenasesystem metabolisiert wird.

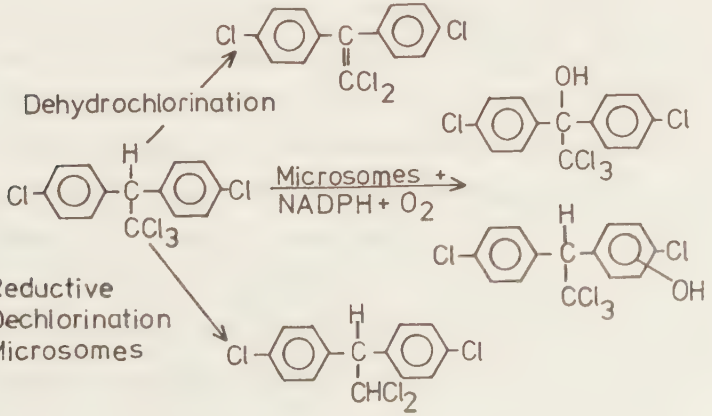


Abb. 1: Abbauwege des DDT im Säugetier (WILKINSON, 1968)

1. Durch Dehydrochlorierung entsteht DDE, das ebenfalls gut lipidlöslich ist und im Fett abgelagert wird. 57 % der oben genannten Gesamtgehalte entfallen auf DDE.

2. Quantitativ kaum eine Rolle spielt die Hydroxylierung in der menschlichen Leber. Vorwiegend wird dieser Abbauschritt von Insekten durchgeführt, die eine DDT-Resistenz entwickelt haben.

3. Durch reduktive Dechlorierung kann durch das mikrosomale Enzymsystem DDD gebildet werden, das nach Abspaltung von weiteren zwei Chloratomen wasserlöslich wird und durch die Niere als Dichlordiphenylessigsäure ausgeschieden werden kann.

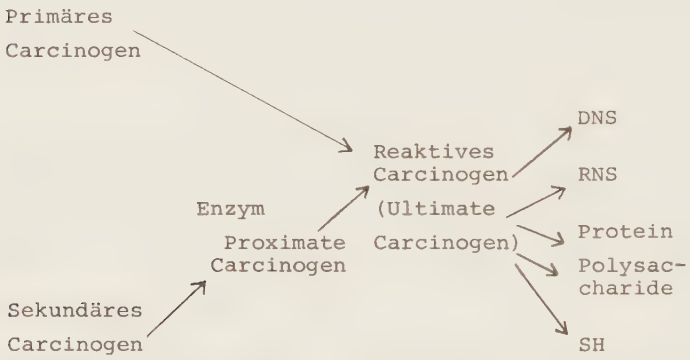
Die akute Toxizität von DDT ist gering, die seiner Metabolite noch geringer (BAILEY et al., 1969). Akute Vertungssymptome in Form zentralnervöser Störungen treten erst nach Aufnahme von 16 mg oder mehr/kg auf (DEICHMANN, 1972). Noch umstritten ist die Beurteilung der chronischen Toxizität.

Im Tierversuch lassen sich bei Erreichen der bei Amerikanern und Westeuropäern im Fettgewebe gefundenen DDT-Konzentrationen von 2-20 ppm in der Leber die Bildung von Lipopheren nachweisen (ORTEGA et al., 1956). Bei höheren Fettkonzentrationen kommt es zu einer Induktion des arzneimittelabbauenden Enzymsystems der Lebermikrosomen und zur elektronenmikroskopisch nachweisbaren Vermehrung der enzymatischen Strukturen des glatten ER (REMMER et al., 1963,

1965, 1967; GREIM et al., 1966, 1967; CONNEY et al., 1967). Die starke Induktion des Monooxygenasesystems ist mit einer auf Hypertrophie und Hyperplasie beruhenden Lebervergrösserung verbunden (KUNZ et al., 1966). Dieses Phänomen der Enzyminduktion, das bei Einwirkung vieler Arzneimittel und Fremdstoffe auftritt, wird heute weitgehend als Adaptation an die erhöhte funktionelle Belastung angesehen, der keine toxikologische Bedeutung zukommt. Deshalb wurde die starke und lang anhaltende induzierende Wirkung des DDT und der DDT-Metaboliten therapeutische genutzt und zur Steigerung der Glucuronyltransferase bei Icterus gravis neonatorum und idiopatischen Hyperbilirubinämien eingesetzt (YEUNG et al., 1969; GREIM et al., 1970). Gegenüber anderen Induktoren, z.B. Phenobarbital, zeichnet sich DDT durch seine länger anhaltende Induktionszeit und im therapeutisch angewandten Bereich durch das Fehlen von zentralnervösen Alterationen aus.

Gemeinsames Prinzip dieser therapeutischen Anwendung ist die Beschleunigung von Abbau und Glucuronidierung primär toxischer Stoffe. Wir wissen heute jedoch, daß die Funktion des mikrosomalen Metabolisierungssystems keinesfalls generell den Charakter einer Entgiftung besitzt. Wie an CCl_4 (McLEAN et al., 1966) und für viele andere Substanzen gezeigt wurde, kann dieser Mechanismus in den Fällen zu einer gesteigerten Giftung führen, wenn primär untoxische Stoffe erst durch Metabolisierung in toxische Reaktionsprodukte übergeführt werden. Dies gilt auch vor allem für sekundäre Carcinogene, wie DENA, polycyclische Kohlenwasserstoffe, Arylamide, die erst

einer Metabolisierung im Organismus bedürfen, um in ihre eigentlich krebsauslösenden Formen, "ultimate carcinogens", übergeführt zu werden (MILLER, 1970; POPPER et al., 1973; CZYGAN et al., 1974). Diese Zusammenhänge wurden von FARBER (1973) in folgendem Schema verdeutlicht.



Aufgrund dieser Zusammenhänge war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Wirksamkeit sekundärer Carcinogene durch DDT-Induktion gesteigert wird. Wegen fehlender experimenteller Daten kann diese Frage zur Zeit nicht beantwortet werden. Auch die Möglichkeit einer hepatocarcinogenen Eigenwirkung von DDT wird noch kontrovers beurteilt. Da die Hydroxylierung von DDT (Abb. 1) über die Epoxidbildung verläuft, sind die molekulartoxikologischen Voraussetzungen durchaus gegeben.

Eine Erhöhung der Lebertumorrate durch DDT-Applikation wurde bisher nur bei männlichen CF-1 Mäusen gefunden, jedoch nicht bei Weibchen, anderen Mäusestämmen und anderen Tierspezies (SHABAD et al., 1972; TURUSOV et al., 1973; TOMATIS et al., 1972, 1974). Auch beim Menschen, bei be-

ruflich DDT-exponierten Arbeitern und durch Versuche an Freiwilligen konnten selbst bei hohen DDT-Konzentrationen im Fettgewebe keine Anhaltspunkte für eine carcinogene Wirkung des DDT gefunden werden (DEICHMANN, 1972).

Trotz dieser überwiegend negativen Ergebnisse ist jedoch eine schwach carcinogene, während der Lebenszeit nicht zur Tumormanifestation führende Wirkung, nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche, schwach carcinogene oder cocarcinogene Wirkung von DDT durch Anwendung geeigneter Testmethoden zu klären. Dazu wurde weiblichen Wistar-Ratten DDT alleine und in Kombination mit dem sekundären Carcinogen DÄNA appliziert. DÄNA wurde als Carcinogen gewählt, weil es in einem Dosisbereich, der keine akut-toxischen Schädigungen hervorruft, Leberkarzinome erzeugt, für deren Entstehung von DRUCKREY et al. (1962) exakt definierte Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt wurden. Eine schon sehr schwach hepatocarcinogene Eigenwirkung von DDT sollte sich dann aufgrund einer zu erwartenden syncarcinogenen Wirkung im Kombinationsversuch durch die Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen erkennen lassen. Nach dem gleichen Prinzip kann auch die zweite Frage nach einer möglichen Wirkungsbeeinflussung sekundärer Carcinogene durch Veränderung der Carcinogenmetabolisierung geklärt werden. Zur Beurteilung dieses Problems war DÄNA ebenfalls besonders geeignet, weil hier der zum ultimate carcinogen führende Reaktionsweg sowie die initiale celluläre Wirkung weitgehend geklärt sind.

Es wird allgemein als gesichert angesehen, daß DÄNA durch eine Cytochrom P450 abhängige Reaktion zunächst am α-C-Atom hydroxiliert wird, worauf eine Abspaltung von Acetaldehyd erfolgt. Die als Zwischenprodukt entstehende Monoäthylverbindung ist äußerst instabil und zerfällt in physiologischem Milieu unter Bildung eines reaktiven Alkylcarboniumion, das zelluläre Makromoleküle alkyliert. Als Ursache der carcinogenen Wirksamkeit der Dialkylnitrosamine wird eine Alkylierung der Nukleinsäuren, vor allem der DNS, angesehen. Als Hauptprodukt wird 7-Alkylguanin gefunden; ursächliche Bedeutung für die Transformation scheint jedoch das in geringerem Maße entstehende 6-O-Alkylguanin zu haben.

Als zelluläre Frühwirkung finden sich nach DÄNA-Applikation in der Leber Zellen mit verschiedenen, irreversiblen Enzymdefekten (FREKSA et al., 1969a). Beim Ausfall histochemisch nachweisbarer Enzyme, wie ATPase, Glucose-6-phosphatase, lassen sich diese enzymdefekten Zellen vom umgebenden Gewebe als scharf umschriebene Inseln abgrenzen. Zwischen Carcinogendosis, Applikationsdauer und Latenzzeit sowie Zahl, Größe und Koinzidenz enzymdefekter Zellen bestehen definierte quantitative Beziehungen. Unter Zugrundelegung des Wirkungsparameters Inselfläche ergeben sich für ein bestimmtes Carcinogen die gleichen Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen, die von DRUCKREY (1962) aufgrund der Parameter Tumorbildung und Tumortod bei erheblich längeren Applikations- und Beobachtungszeiten ermittelt wurden (STÖCKLE, 1978). Die

quantitative Erfassung von Zahl und Wachstum der enzymdefekten, präneoplastischen Areale stellt deshalb ein sehr empfindliches Testsystem zur Bestimmung carcinogener Wirkungen und deren pharmakologischer Beeinflussung dar. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit, zwischen einer Beeinflussung der carcinogenen Initialwirkung und der Proliferationskinetik transformierter Zellen zu differenzieren.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb zur Beurteilung einer schwach carcinogenen Eigenwirkung von DDT und einer Wirkungsbeeinflussung gleichzeitig aufgenommener hepatocarcinogener Substanzen quantitative Analysen dieser präcancerösen Zellveränderungen durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material und Versuchstiere

2.1.1. Chemikalien, Substrate und Enzyme

DDT: Fa. Geigy, Basel

Adenosin-5'-triphosphat, Glucose-6-phosphat, Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz EC 1.1.1.42., NADP: Fa. Boehringer, Mannheim

DL-Isozitronensäure $x2H_2OxNa_3$, Triton X-114: Fa. Serva, Heidelberg

DÄNA, DMNA, PPO, Entellan$^{(R)}$ 4-Nitroanisol, Kresylviolett: Fa. Merck, Darmstadt

Carnoy'sche Fixierlösung: 60 Vol % Äthanol abs.
30 Vol % Chloroform
10 Vol % Eisessig

^{14}C-DMNA: Hergestellt nach einer Vorschrift von DUTTON & HEATH (1956).

Puffer Mic I	0.25 M Saccharose
	5.5 mM EDTA
	0.02 mM Tris-HCl pH 7.5
Puffer Mic II	4 Teile 0.15 M KCl
	1 Teil 0.25 M Tris-HCl pH 7.5
Nash Reagenz	150 g Ammoniumacetat
	2 ml Acetylaceton
	3 ml Essigsäure konz.
	eingestellt auf pH 6.0

NADPH-regenerierendes System für 10 mg Protein:	20 µl Isocitrat-Dehydrogenase (10 mg/ml)
	11,75 mg DL-Isocitrat-Na_3 x$2H_2O$
	3.94 mg NADP x Na_2
	40 µMol $MgCl_2$ x $6H_2O$
Scintillations-Lösung	600 ml Triton X-114
	7.2 g PPO
	mit Xylol auf 2,4 l aufgefüllt.

2.1.2. Tiere und Tierhaltung

Versuchstiere waren weibliche Wistar-Ratten der Versuchstierzuchtanstalt S. Ivanovas KG, Kisslegg/Allgäu. In klimatisierten Räumen wurden die zu Versuchsbeginn 150 ± 5 g schweren Tiere bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Als Nahrung erhielten sie Preßfutter Altromin der Firma Altrogge, Brackwede und Leitungswasser aus Saugflaschen ad libidum.

2.1.3. Applikation der Substanzen

Nach 14-tägiger Adaption an ihre neue Umgebung erhielt ein Teil des Tierkollektivs 3 mal 100 mg/kg DDT, 2 %ig in Olivenöl gelöst in jeweils 3-wöchigem Abstand i.p. appliziert. DÄNA wurde als 0.05 %ige wässrige Lösung in Einzeldosen zu 5 mg/kg den Tieren per Schlundsonde verabreicht, um somit eine exakte Dosierung zu gewährleisten. Parallel dazu wurde eine gleichaltrige, aus 10 unbehandelten Tieren bestehende Kontrollgruppe mit aufgezogen. Bei Behandlungsende betrug die Gesamtdosis DDT 300 mg/kg sowie 60, 120, 240 mg/kg DÄNA.

2.2. Histochemische Untersuchungen

2.2.1. Organentnahme und Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur histochemischen Untersuchung wurden aus jeder Gruppe jeweils 3 Tiere, nachdem sie 16 Stunden nüchtern gesetzt waren, durch Dekapitation getötet, gut ausgeblutet, die frei präparierte Leber sofort entnommen und ein Gewebestück aus dem mittleren Leberlappen auf einem Kryostattisch nach DITTES mit CO_2 eingefroren. In einem Kryostaten nach LINDE wurden in drei verschiedenen Ebenen 10 µ dicke Schnitte angefertigt, auf einem vorgekühlten Objektträger aufgetaut, unter einem kalten Föhn getrocknet und bei -18°C 12-24 h gelagert.

2.2.2. ATPase-Reaktion

Zum ATPase-Nachweis wurden die Schnitte nach der Bleisalzmethode angefärbt. Hierbei wird durch die ATPase aus ATP Phosphat abgespalten, welches im alkalischen mit Calcium-Ionen, im neutralen und sauren Bereich mit Bleiionen als weißes Pyromorphit ausfällt. Durch anschliessende Umfällung in Ammoniumsulfid wird das weiße Pyromorphit in schwarzes, gut sichtbares, unlösliches Bleisulfid überführt.

Färbegang:

- Vorfixieren in 0.5 %igem Glutaraldehyd	5 sec
- Wässern in fließendem Wasser	1 min
- Inkubation bei 37°C	1 h
- Spülen in Leitungswasser	3 sec

- Fällung in O.75 %igem Ammoniumsulfid bis zur Braunfärbung	1-1,5 min
- Wässern in Leitungswasser	3 sec
- Fixieren in 5 %igem Glutaraldehyd mit Zusatz von 5 % Eisessig	15 min
- Wässern in fließendem Wasser	5 min
- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun	5 min
- Differenzierung in aqua dest.	
- Wässern in fließendem Wasser	15 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe	je 1 min
- Xylol	2 x 1 min
- Eindecken mit Entellan(R)	

Ansatz der Inkubationslösung zum ATPase-Nachweis.

60 ml O.2 M Trismaleatpuffer wurden mit 1N NaOH auf pH 7.2 eingestellt und 65 ml aqua dest., 10 ml 2 %iges Bleinitrat, 15 ml O.1 m Magnesiumsulfat und 125 mg Adenosin-5'-triphosphat zugesetzt. Die Lösung wurde 15 min mit einer Wasserstrahlpumpe entlüftet und auf 37°C temperiert.

2.2.3. Färbung mit Kresylviolett

Von den Gruppen, die 8 Wochen DÄNA sondiert bekamen, wurde ein zusätzlicher Parallelschnitt mit Kresylviolett gefärbt, um die Koinzidenz von enzymfreien Inseln und den Grad der Basophilie beurteilen zu können (RITTER et al., 1961).

Färbegang:

- Fixieren in Carnoy	5 min
- Inkubation in O.1 %iger wässriger Kresylviolettlösung, die auf pH 4.2 mit HCl eingestellt ist, bei 45°C	2 Std

- Farbstoffstabilisierung in 1 %iger Ammoniumheptamolybdatlösung 5 min
- Aufsteigende Alkoholreihe je 1 min
- Xylol je 2 min
- Eindeckung in Entellan(R)

2.3. Biochemische Untersuchungen

Weiterhin wurde die Einwirkung von DÄNA und DDT alleine und in Kombination auf die mikrosomale Hydroxylierung in einem Kurzzeitversuch untersucht. 3 Gruppen zu je 3 weiblichen 120 g schweren Wistar-Ratten wurden durch einmalige i.p. Injektion von 100 mg/kg DDT, 2 %ig in Olivenöl gelöst, behandelt. 7 Tage später wurde DÄNA als 0.05 %ige wässrige Lösung den Tieren per Schlundsonde verabreicht.

2.3.1. Organentnahme und Mikrosomenpräparation

Einen Tag nach Behandlungsende wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, gut ausgeblutet, die präparierte Leber nach Entnahme gewogen, in eisgekühltem Puffer Mic I mit der Schere zerkleinert und im Verhältnis Leber/Puffer 1 : 4 mit einem Glas-Teflon Potter homogenisiert. Durch je 10-minütiges Zentrifugieren bei 5000, 7000, 9500 UpM wurden Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien abgetrennt. Der Überstand wurde weitere 60 min bei 100.000 g zentrifugiert, die dadurch sedimentierten Mikrosomen in Tris/KCl-Pufferlösung (Puffer Mic II) resuspendiert und anschließend nochmals bei 100.000 g 60 min zentrifugiert.

Anschließend wurde das Mikrosomenpellet in 10 ml Tris/KCl-Puffer (Mic II) mit einem Glaspotter suspendiert und eine Proteinbestimmung nach 2.3.2. vorgenommen.

2.3.2. Bestimmung von Protein

Die quantitative Bestimmung des mikrosomalen Proteins wurde nach LOWRY (1951) durchgeführt. Bei 750 nm wurde die Extinktion am Beckman Photometer, Modell 25 gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichkurve ermittelt. Als Eichsubstanz diente Rinderserumalbumin.

2.3.3. Bestimmung von Cytochrom P450 und Cytochrom b_5

Die Bestimmung der Cytochromgehalte in mikrosomalem Protein wurde nach OMURA und SATO (1964) durchgeführt. Die Mikrosomensuspension wurde auf eine Konzentration von 2 mg/ml mit Puffer Mic II verdünnt und in zwei Standardküvetten gefüllt. Die Differenzspektren wurden im Bereich von 600 nm - 380 nm geschrieben. Cytochrom b_5 wurde durch Zugabe von NADH, Cytochrom P450 durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit und Einleiten von CO in die Meßküvette sichtbar gemacht. Die Konzentration an Cytochromen wurden aus den Differenzspektren nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Cytochrom P450 (nMol/ml)} = E_{450\text{-}490\ nm} \times 10{,}989$$

$$\text{Cytochrom } b_5 \text{ (nMol/ml)} = E_{424\text{-}450\ nm} \times 9{,}530$$

2.3.4. Bestimmung der Nitroanisol-Demethylierung

Nacheinander wurden in eine Meßküvette 0.5 ml Mikrosomensuspension (10 mg Protein/ml), 0.5 ml NADPH regenerierendes System und 1 ml Mic II Puffer pipettiert. Nach Reaktionsstart durch Zugabe von 0.5 ml Nitroanisollösung wurde bei 405 nm die Extinktion am Eppendorf-Photometer gemessen, die Kinetik mit einem Eppendorf Kompensationsschreiber registriert. Die Demethylierungsrate wurde anhand einer Eichkurve ermittelt, die durch Zugabe steigender Konzentrationen an p-Nitrophenol zu einem Meßansatz erstellt wurde.

2.3.5. Formaldehydbestimmung

Zur Bestimmung von Formaldehyd aus DMNA wurde die Mikrosomeninkubation in 25 ml Erlmeyer-Weithalskolben vorgenommen. Diese wurden in einem Wasserbad bei konstanter Temperatur von 37°C geschüttelt. Durch Zugabe von Substrat (DMNA) wurde die Reaktion gestartet. Die Proteinkonzentration betrug 4 mg/ml. Die DMNA-Konzentration war 135 mM. Es wurde in Tris KCl Puffer (Mic II) inkubiert. Nach 30 min wurde 1 ml Mikrosomeninkubat entnommen und in 1 ml 7.5 %iger TCA pipettiert. Nach der Methode von NASH (1953) wurde Formaldehyd bestimmt. Zur vollständigen Praezipitation der Proteine wurde der Ansatz 30 min in Eis gestellt, die Proteine abzentrifugiert und 1 ml des klaren TCA-Überstandes mit 1 ml Nash-Reagenz versetzt. Es wurde 12 min bei 58°C im Wasserbad inkubiert und nach Ab-

kühlen die Extinktion bei 412 nm am Beckman Photometer gemessen. Nach der Eichkurve entsprach E_{412} nm von 1.0 = 493 nMol CH_2O bei einer Entnahme von 1ml Suspension.

2.3.6. Bestimmung der Alkylierung

Zur Bestimmung der Alkylierung mikrosomaler Proteine wurde ^{14}C-DMNA mit einer Konzentration von 0.27 mM eingesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie unter 2.3.5. beschrieben, durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurden die Ansätze mit 10 mg Protein mit dem gleichen Volumen an TCA gestoppt. Nach vollständiger Praezipitation im Eisbad wurden die mikrosomalen Proteine in Anlehnung an eine Vorschrift von UEHLEKE et al. (1973) wie folgt aufgearbeitet.

Die Proteine wurden mit den nachstehenden Waschflüssigkeiten jeweils 10 min in Schliffgläsern geschüttelt. Nach erfolgter Extraktion mit 5 %iger TCA wurde mit aqua dest. 3 mal gewaschen. Zur Lipidextraktion und Entfernung von lipidlöslichen Metaboliten wurde mit Alkohol bei 90°C im Wasserbad 15 min erhitzt, mit Chloroform/Methanol (1/1), Äthanol/Äther (1/1) und Äther gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde zentrifugiert und die Waschflüssigkeit dekantiert. Nach der Ätherwaschung wurden die Proteine getrocknet, in 1 ml 1N NaOH aufgenommen und mit HCl neutralisiert. 1 ml wurde zur Proteinbestimmung nach 2.3.2., 1 ml zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

2.3.7. Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitätsmessung wurde mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler BF 502 der Fa. Berthold & Friesecke mit angeschlossenem Diehl-Algotronic-Rechner gemessen. Gezählt wurde jeweils 1 ml des in 1N NaOH gelösten und anschließend neutralisierten mikrosomalen Proteins in 10 ml Xylol-Triton-Scintillator (ANDERSON et al., 1973).

2.4. Statistische Berechnung

Die statistische Beurteilung der Signifikanz der Mittelwertdifferenzen von Kontroll- und Versuchsgruppen erfolgte mit dem t-Test nach STUDENT. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde den Geigy-Tabellen entnommen. Als statistisch gesichert galten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$.

Geprüft wurden Inselvolumen und relatives Lebergewicht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Theoretische Grundlagen zur quantitativen Analyse von Gewebestrukturen und ihre praktische Anwendung zur Bestimmung enzymdefekter Zellherde

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel, durch quantitative Erfassung von Zahl und Größe enzymdefekter präneoplastischer Zellverbände Hinweise auf eine mögliche hepatocarcinogene oder co-carcinogene Wirkung von DDT zu geben. Diese Zellgruppen, die quantitativ analysiert werden mußten, dehnen sich als kugelförmige Strukturen aus. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung im histologischen Schnitt erscheinen diese dreidimensionalen Strukturen als Fläche. Nach dem später formulierten Delesse-Prinzip ist der Flächenanteil dieser Strukturen an der Gesamtfläche proportional der Volumendichte. Der räumliche Aufbau dreidimensionaler Strukturen kann dadurch quantitativ erfaßt werden, daß nach wahrscheinlichkeitsmathematischen und stereologischen Grundsätzen eine Extrapolation zweidimensionaler Parameter in den dreidimensionalen Raum erfolgt. Dabei müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1) Die zu untersuchenden Strukturen müssen die gleiche Form besitzen,
2) sie müssen statistisch gleichmäßig verteilt sein,
3) es muß eine Stichprobenauswahl gewährleistet sein, die streng den Zufallskriterien entspricht und deren Zahl für die sichere Festlegung des Mittelwertes ausreicht.

Daß die unter 1. und 2. geforderten Bedingungen erfüllt sind, konnten SCHERER et al. (1972) nachweisen. Die Ermittlung von Inselzahl und Fläche kann prinzipiell nach zwei Grundverfahren erfolgen.

3.1.1. Planimetrie

Bei diesem Verfahren wird unmittelbar die Größe der Einzelflächen bestimmt und darauffolgend durch deren Summation ihr relativer Anteil an einer definierten Fläche ermittelt.

3.1.1.1. Okularplanimetrie

In den bisher publizierten Arbeiten (FREKSA et al., 1969a,b), auf die die vorliegende Untersuchung aufbaut, wurden die histologischen Präparate nach dieser Methode ausgewertet. Anfänglich wurde dieses Verfahren bei den vorliegenden Untersuchungen beibehalten. In das Okular eines binokularen Mikroskops wird dazu ein Quadratraster eingelegt, der in 100 gleichflächige Quadrate unterteilt ist. Unter der Sicht des Auges werden die Quadrate ausgezählt, die über einer Insel zu liegen kommen. Quadrate, die an den Rand einer Insel projiziert werden, dürfen nur als halbe Quadrate gezählt werden. Gleichzeitig werden Anzahl der Gesichtsfelder und die numerische Dichte der Inselareale registriert. Durch Summation der einzelnen Inselflächen pro Gesichtsfeld wird die Inselgesamtfläche ermittelt. Ausgezählt werden 50 Gesichtsfelder streng nach Zufallskriterien.

3.1.1.2. Projektionsplanimetrie

Durch Umfahren der Umgrenzung einer ebenen Fläche beliebiger Form mit einem Planimeter wird der Flächeninhalt ermittelt. Dazu werden bei n-facher Vergrößerung die Gewebeschnitte auf eine Mattscheibe projiziert, die enzymfreien Inseln auf ein quadratisches Transparentpapier mit 10 cm Kantenlänge, das der Mattscheibe aufgeklebt wird, durchgezeichnet. Bei Schnitten mit geringer Inselanzahl können die Inseln von bis zu fünf Gesichtsfeldern auf ein Quadrat durchgezeichnet werden. Die Fläche der einzelnen Inseln pro Gesichtsfeld wird mit einem Aristo-Planimeter ermittelt und anschließend der prozentuale Anteil der enzymfreien Inseln an der bekannten Gesamtfläche errechnet. Um eine statistisch gesicherte Aussage zu erhalten, müssen auch hier mindestens 50 Gesichtsfelder streng nach Zufallskriterien ausgewertet werden.

3.1.2. Integrationsverfahren

Bei diesen beiden Planimetrierverfahren werden die Flächen der Einzelinseln direkt gemessen und nach Addition der prozentuale Anteil am Gesamtgewebe errechnet. Bei den Integrationsverfahren wird aufgrund der Wahrscheinlichkeitsrechnung zunächst die Gesamtinselfläche und die Zahl der Inseln ermittelt und danach durch Division die mittlere Einzelinselgröße errechnet. Hierbei werden die planimetrischen und volumetrischen Meßvorgänge zur quantitativen Analyse räumlicher Strukturen durch die Anwendung

stereometrischer Methoden auf einfache Zählvorgänge reduziert.

3.1.2.1. Messung von Fläche und Volumen

Nach GLAGOLEFF (Zit. nach WEIBEL et al., 1969; BARTSCH et al., 1975) gilt, daß die Flächendichte einer Struktur durch Bestimmung der Punkte ersetzt werden kann, die über der Struktur zu liegen kommen. Die Punkte müssen jedoch regelmäßig in Form eines Rasters angeordnet sein.

$$A_{Ai} = P_{Pi} \qquad (1)$$

Nach dem Delesse-Prinzip, dessen Gültigkeit von o.g. Autoren bestätigt wurde, gilt, daß die Volumendichte einer Struktur proportional dem Flächenanteil dieser Struktur i an der Gesamtoberfläche des Objektprofils ist.

$$V_{Vi} = A_{Ai} \qquad (2)$$

Aus der Gleichung 1 und 2 ergibt sich, daß die Tefferzahl, die mit Hilfe eines definierten Rasters ermittelt wird, proportional dem Gesamtstrukturvolumen am Gesamtvolumen ist.

$$V_{Vi} = P_{Pi}$$

3.1.2.2. Messung der numerischen Dichte

Die numerische Dichte im Gewebevolumen kann nach der Formel von DeHOFF und RHINES (ROHR et al., 1976) berechnet werden.

$$N_{Ai} \tilde{=} N_{Vi} \cdot \bar{D}_i$$

Unter den gegebenen Bedingungen, daß die Inselstrukturen gleich verteilt sind und einen Mindestdurchmesser von 80 µ besitzen, ist es möglich aus Zahl und Fläche der im Gewebeschnitt erfaßten Inseln auf Volumen und numerische Dichte der Inseln ohne wesentliche Korrektur zu schließen (SCHERER et al., 1972).

Symbole und ihre Definition

A : Fläche eines Schnittes (cm^2)

V : Volumen einer Struktur (cm^3)

P : Anzahl der Testpunkte

i : Index für beliebige Strukturen

N_{Ai} : Anzahl der Inseln in der Schnittfläche

N_{Vi} : Anzahl der Inseln im Gewebevolumen

$\bar{D}_i$: Mittlerer Inseldurchmesser

Die meßtechnischen Daten für diese Berechnungen wurden mit den nachfolgenden Verfahren erhalten.

3.1.2.3. Integrationsplatte

Die Mattscheibe des Klarex-Schirms der Fa. Zeiss, Oberkochen, wurde gegen die Integrationsplatte II derselben Firma ausgetauscht und der Klarex-Schirm auf ein Forschungsmikroskop der Fa. Zeiss aufgesetzt. Nach Eichung des Mikroskops mit einem Eichmikrometer wurden die histologischen Schnitte bei 103-facher Vergrößerung betrachtet.

Mit Hilfe des Zellzählgerätes der Fa. Ferrari Statitest wurden alle Punkte auf der Integrationsplatte, die über Inselareale zu liegen kamen fortlaufend gezählt.

Punkte, die auf den Inselrand projiziert wurden, wurden als halbe Teffer gewertet. In einem zweiten Kanal wurde die numerische Dichte der Inseln registriert, in einem weiteren Kanal die Anzahl der ausgewerteten Gesichtsfelder. Je nach Präparatgröße wurden zwischen 100 und 200 Gesichtsfelder, entsprechend 1-2 cm^2, ausgewertet, wobei streng nach Zufallskriterien verfahren wurde. Die Berechnung der Volumendichte erfolgte nach folgender Formel:

$$V_i = \frac{P_i}{P_t}$$

3.1.2.4. Manuell-optischer Bildanalysator

Der von der Firma Contron, München, konstruierte M.O.P. KM II ist ein halbautomatischer, elektronischer Stichprobenanalysator, der aus einer Zähl-, Speichereinheit, Kontaktrasterplatten sowie aus einem Druck- und optoelektrischen Stift besteht. Impulse, die durch den Kontakt zwischen Optostift und Rasterplatte erzeugt werden, lassen sich in 12 Kanälen speichern und können auf einer Meßanzeige abgelesen oder auf einem Registrierstreifen abgedruckt werden. Verwendet wurde ein Quadratraster mit 1600 Trefferpunkten. Inselanzahl, Gesichtsfelder und Volumenanteil der einzelnen Inseln wurden in 3 verschiedenen Kanälen gespeichert und anhand der gewonnenen Daten das prozentuale Inselvolumen am Gesamtvolumen nach obiger Formel berechnet.

3.1.2.5. Scanning-Verfahren

Dieses Verfahren beruht auf der Fernsehtechnik. Hierbei werden durch systematisches Abrastern der Gewebeproben mit Hilfe der Elektronik die einzelnen Strukturen aufgrund ihrer Graustufen differenziert und als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche angegeben. Für die Anwendung des Scanning-Systems müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die Grauabstufungen zwischen den einzelnen Strukturen müssen deutlich konturiert sein.
2. Verschiedene Strukturen müssen verschiedene Grautöne aufweisen. Sobald verschiedene Strukturen gleiche Grautöne aufweisen, können sie nur dann vom Computer des Scanning-Systems differenziert werden, wenn einfache registrierbare Parameter gegeben sind.
3. Artefakte, die in ihrem Grauton und ihrer Form den zu zählenden Strukturen gleich sind, dürfen nicht mitgezählt werden.

3.1.3. Beurteilung der einzelnen Meßverfahren

Ein Vergleich der einzelnen Meßverfahren hinsichtlich ihrer Genauigkeit, ihrer Zeitintensität und ihrer Anwendbarkeit für die quantitative Analyse histologischer Präparate ergab folgende Beurteilung:

Mit den beiden Planimetrierverfahren lassen sich genaue, quantitative Ergebnisse erzielen. Sie besitzen den Vorteil, die direkte Bestimmung der Einzelinselgrößen und deren Verteilung zu erlauben. Das Projektionsplanimetrierverfahren bringt den weiteren Vorteil, daß bei der Anfer-

tigung von Parallelschnitten die Koinzidenz mehrerer Enzymdefekte gut beurteilt werden kann. Erheblicher Nachteil dieser Verfahren ist der enorme Zeitaufwand für grössere Untersuchungsreihen. Zudem stellt der Auswertungsvorgang so hohe Anforderungen an Konzentration und Sehvermögen, daß ein Untersucher nur wenige Stunden zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erzielen kann.

Zur quantitativen Auswertung von Zahl und Gesamtvolumen enzymdefekter Inselareale ist den Integrationsverfahren eindeutig der Vorrang gegenüber den Planimetrierverfahren einzuräumen. Sie sind zumindest bei gleicher Genauigkeit erheblich zeitsparender und weniger ermüdend.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb vollständig mit Hilfe der Integrationsplatte II der Fa. Zeiss durchgeführt. Für einige Meßreihen stand das MOP-System der Fa. Kontron zur Verfügung. Nach den Erfahrungen dieser Probemessungen dürfte es für Routinemessungen am besten geeignet sein. Es besitzt zudem die Möglichkeit, die Größe und Verteilung der Einzelinseln in einem gleichen Arbeitsvorgang zu erfassen.

Über die Verwendbarkeit des vollautomatischen Scanning-Verfahrens kann noch kein abschließendes Urteil abgegeben werden. Bei Probemessungen mit dem Videomaten der Fa. Zeiss, Oberkochen konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten werden, da die Konturierung der Inselbegrenzung wegen der oft fließenden Übergänge der Grau-

töne unzureichend war. Möglicherweise kann hier eine Verbesserung durch stärkere Kontrastierung der Präparate erreicht werden. Unwahrscheinlich ist es jedoch, daß Artefakte und Gefäßanschnitte sicher bei der Auswertung als solche unberücksichtigt bleiben. Die subjektive Bewertung durch einen erfahrenen Untersucher wird hier immer erforderlich sein.

3.2. Tierexperimentelle Ergebnisse

3.2.1. Versuchsaubau

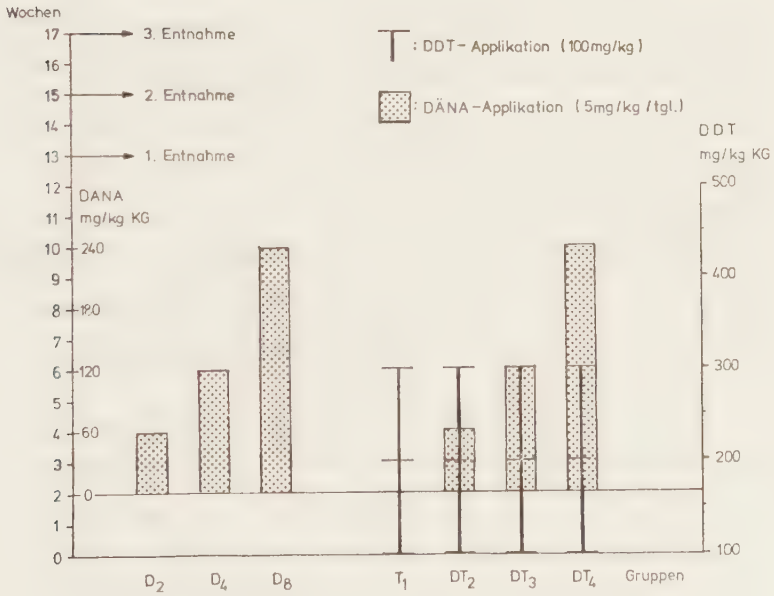


Abb. 2: Versuchsaufbau

Die Untersuchungen wurden nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema durchgeführt. Danach erhielten:

Gruppe DT_2 12 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA und 3 x 100 mg/kg DDT i.p.

Gruppe DT_4 24 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA und 3 x 100 mg/kg DDT i.p.

Gruppe DT_8 48 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA und 3 x 100 mg/kg DDT i.p.

Gruppe T_1 3 x 100 mg/kg/KG DDT i.p.

Gruppe D_2 12 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA

Gruppe D_4 24 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA

Gruppe D_8 48 Tage lang d = 5 mg/kg/KG DÄNA

3.2.2. Allgemeinverhalten und Körpergewicht

Die Tiere aller behandelten Kollektive verhielten sich während der Beobachtungszeit hinsichtlich Motilität, Fellbeschaffenheit, Trink- und Freßverhalten unauffällig. Krankheitssymptome waren nicht festzustellen. Während der Versuchszeit kam kein Tier ad exitum. Die wöchentlich durchgeführten Gewichtskontrollen zeigten, wie in Abb. 3 dargestellt, eine Gewichtsreduktion während der ersten Sondierungswoche und anschließend eine geringere Gewichtszunahme, die bei Behandlungsende schnell kompensiert war.

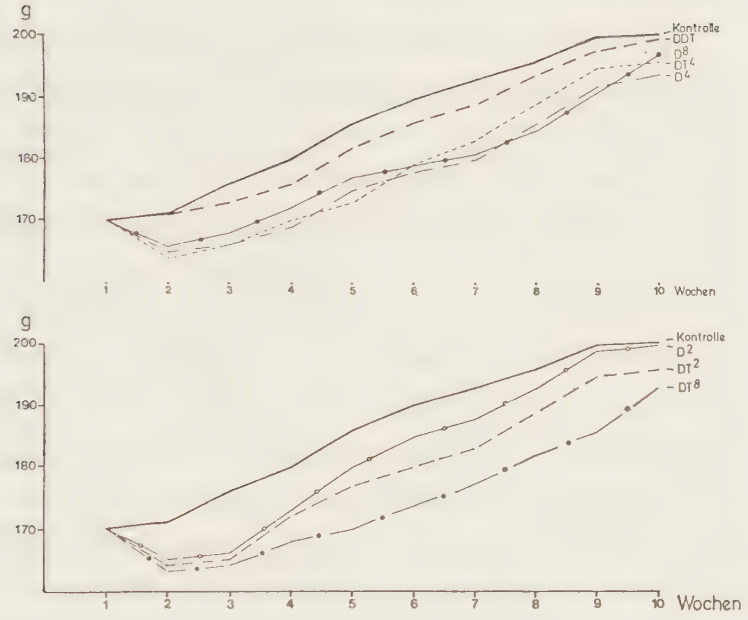


Abb. 3 Zunahme des Körpergewichts der einzelnen Tierkollektive während der Versuchszeit.

3.2.3. Makroskopischer Organbefund

Bei der Sektion des Abdomens wurden keine pathologischen Organveränderungen gefunden, insbesondere fehlten jegliche Hinweise auf entzündliche Prozesse. Die Leber der induzierten Tiere war vergrößert, in Farbe, Konsistenz und Oberflächenbeschaffenheit jedoch unverändert. Die Leber der mit DÄNA behandelten Tiere war im niedrigeren Dosisbereich weitgehend unauffällig, bei Verabreichung höherer Dosen war das Bestehen von "hyperplastischen Knötchen" schon makroskopisch sichtbar.

3.2.4. Relatives Lebergewicht

Die frisch entnommene, präparierte Leber wurde noch vor dem Tieffrieren gewogen und das relative Lebergewicht in g/100 g Körpergewicht ermittelt. Bei den drei in 2-wöchentlichem Abstand durchgeführten Entnahmen war das relative Lebergewicht aller gleichbehandelten Tiergruppen annähernd konstant, deutliche Unterschiede bestanden jedoch zwischen den einzelnen Dosierungsgruppen. In Tabelle 1 sind deshalb die Mittelwerte aller drei Tiere einer Behandlungsgruppe pro Entnahme zusammengefaßt. Die mit DDT alleine behandelten Tiere zeigten eine signifikante ($p < 0{,}001$) Steigerung des relativen Lebergewichts. Die isolierte DÄNA-Verfütterung führte mit steigender Dosis ebenfalls zu einer zunehmenden Vergrößerung des relativen Lebergewichts. Die stärkste Zunahme zeigten die mit DDT vorbehandelten Tiere bei steigender DÄNA-Dosis. Dieser Effekt kann auf einer Addition der lebervergrößernden Wirkung von DDT und DÄNA oder auf einer hier verstärkten Carcinogenwirkung und den damit verbundenen kompensatorischen Parenchymregenerationen beruhen.

Gruppe	relatives Lebergewicht g/100 g KG	Δ %	p <
Unbehandelte Kontrolle	2,32 ± 0,19	100 %	
T	2,75 ± 0,16	+18,5	0,001
D_2	2,54 ± 0,18	+ 9,4	
D_4	2,59 ± 0,12	+11,6	
D_8	2,93 ± 0,26	+26,3	
DT_2	2,83 ± 0,16	+22	0,025
DT_4	2,86 ± 0,15	+23,3	0,005
DT_8	3,17 ± 0,18	+36,6	0,05

Tab. 1 Beeinflussung des relativen Lebergewichts durch isolierte und kombinierte Applikation von DÄNA und DDT. Die prozentualen Unterschiede sind auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde für die Differenz zwischen Kontroll- und DDT-Kollektiv und zwischen den kombiniert mit DÄNA und DDT behandelten Tiergruppen und den entsprechenden, allein mit DÄNA behandelten Gruppen ermittelt.

3.3. Quantitative Bestimmung von Zahl und Größe enzymdefekter Inseln

Bei den ersten Versuchsreihen wurden sowohl ATPase und Glucose-6-phosphatase-defekte Inselareale nach Größe und Anzahl untersucht. Da bekannterweise die Glucose-6-

phosphatase-Aktivität auch bei Einwirkung von nicht-carcinogenen, toxischen Substanzen stark verändert wird, waren die Präparate nur schwerlich richtig zu beurteilen. In typischer Lokalisation fanden sich Glucose-6-phosphatase-defekte Areale, die mit ATPase defekten Bezirken koinzident waren. Daneben waren jedoch auch bei längerer Latenzzeit in Sinusnähe straßenförmige Leberzellbälkchen mit verminderter Glucose-6-phosphatase-Aktivität zu finden. Deshalb wurden der quantitativen Beurteilung der carcinogenen Wirkung von DÄNA die ATPase-freien Inselareale zugrunde gelegt, die scharf begrenzt, typisch lokalisiert waren.

3.3.1. Abhängigkeit von Zahl, Einzelgröße und Gesamtvolumen enzymdefekter Inseln von der DÄNA-Dosis

Die Abhängigkeit der Ausbildung ATPase-freier Inselareale von der DÄNA-Gesamtdosis ist in Abb. 4a-c dargestellt. Sowohl Inselareale als auch Inselzahl steigen mit zunehmender DÄNA-Gesamtdosis an. Daß bei doppelt logarithmischer Darstellung von Dosis-Wirkungsbeziehung die durch spätere Versuche nachgewiesene lineare Regression der Parameter nicht gefunden wurde, ist durch die Versuchsanordnung bedingt. Die steigende DÄNA-Gesamtdosis wurde, wie aus dem in Abb. 2 dargestellten Versuchsschema hervorgeht, durch verschieden lange, perorale Verabreichung von 5 mg/kg DÄNA/täglich erreicht. Die Applikationszeit betrug demnach für 60 mg 2 Wochen, für 120 mg 4 Wochen und für 240 mg/kg DÄNA-Gesamtdosis 8 Wochen. Da die Leberentnahme

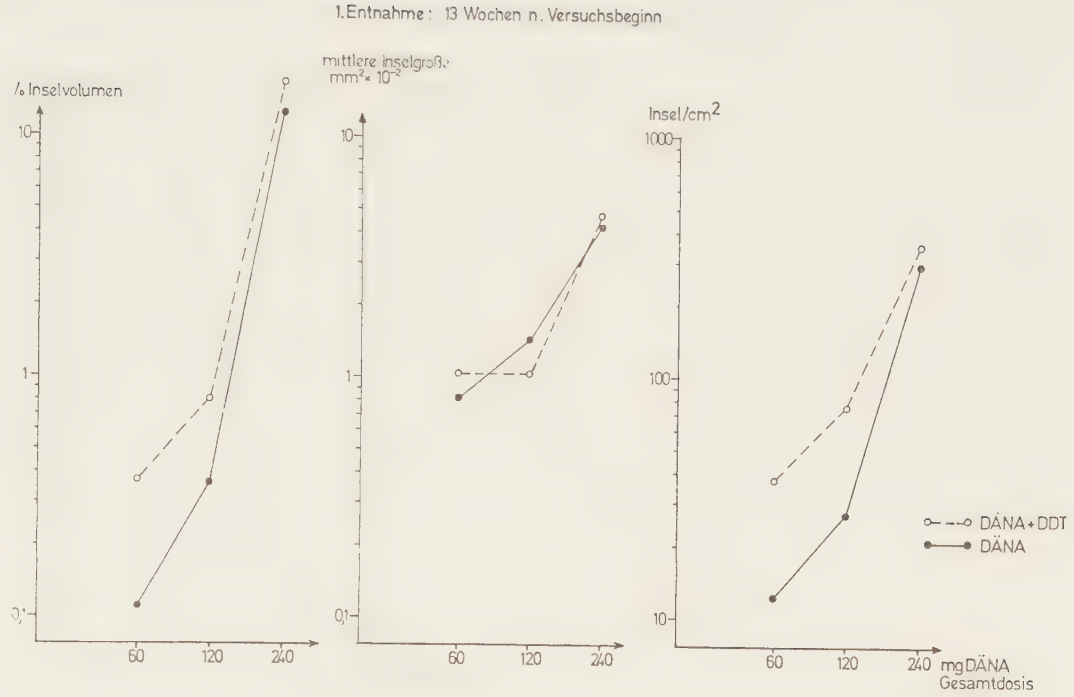


Abb. 4a Gesamtvolumen, mittlere Größe und Zahl ATPase-freier Inseln 13 Wochen nach Versuchsbeginn. Dauer des behandlungsfreien Intervalls bei 60 mg DÄNA-Gesamtdosis 9 Wochen, bei 120 mg 7 Wochen, bei 240 mg 3 Wochen.

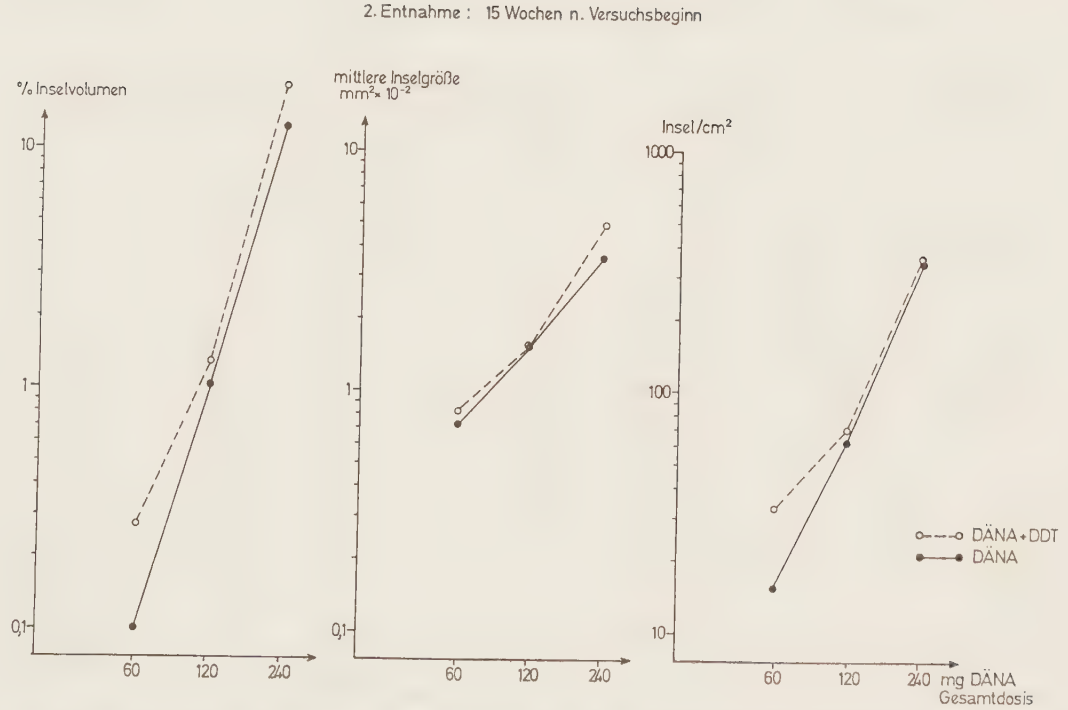


Abb. 4b Gesamtvolumen, mittlere Größe und Zahl ATPase-freier Inseln 15 Wochen nach Versuchsbeginn. Dauer des behandlungsfreien Intervalls bei 60 mg 11 Wochen, bei 120 mg 9 Wochen, bei 240 mg DÄNA Gesamtdosis 5 Wochen.

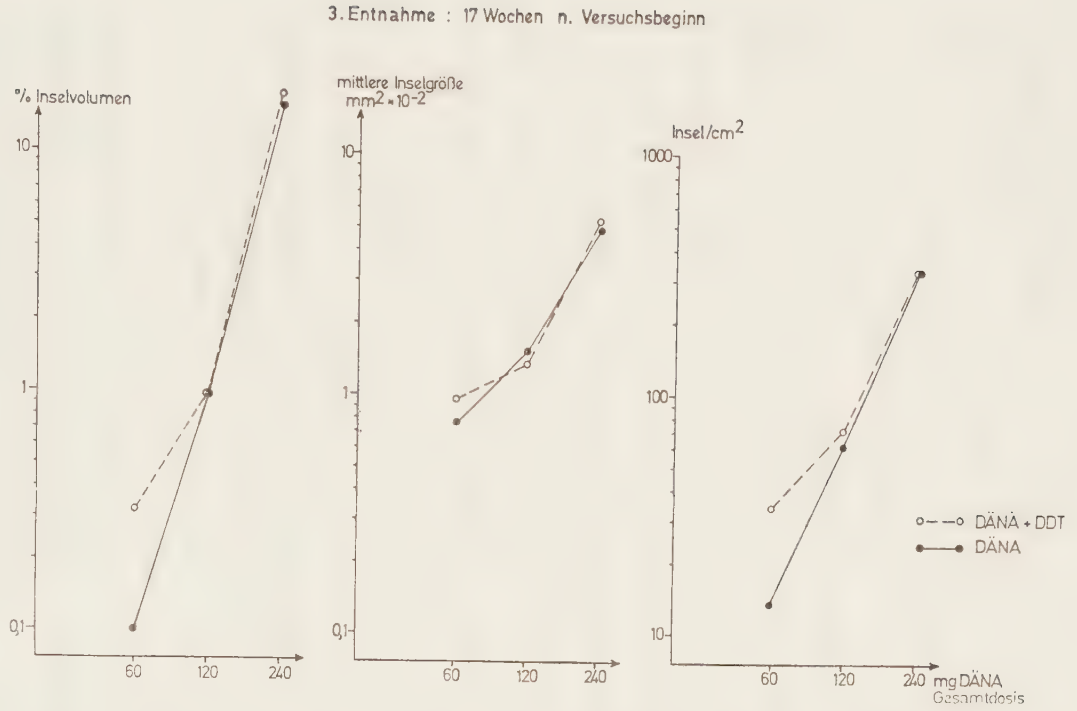


Abb. 4c Gesamtvolumen, mittlere Größe und Zahl ATPase-freier Inseln 17 Wochen nach Versuchsbeginn. Dauer des behandlungsfreien Intervalls bei 60 mg 13 Wochen, bei 120 mg 11 Wochen, bei 240 mg DÄNA-Gesamtdosis 7 Wochen.

bei allen Dosierungsgruppen nach 13, 15 und 17 Wochen nach Versuchsbeginn erfolgte, waren die behandlungsfreien Zeitintervalle verschieden, wie aus den einzelnen Legenden zu ersehen ist. Auf das Verhalten von Zahl und Größe enzymfreier Inseln nach Absetzen des Carcinogen wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

Überraschend zeigte sich bei dieser Versuchsreihe, daß das Ausmaß der präneoplastischen Veränderungen durch Zufuhr von DDT generell gesteigert wurde und nicht gesenkt, wie es für den Induktorstoff Phenobarbital gefunden wurde (KUNZ et al., 1969, STÖCKLE, 1978). Die Erhöhung des Gesamtinselvolumens resultierte aus einer signifikanten Erhöhung der Inselzahlen, während die mittlere Inselgröße sich wenig veränderte. Am deutlichsten ausgeprägt war dieser Effekt im niedrigen Dosisbereich. Bei hohen DÄNA-Gesamtdosen ist die DDT-Wirkung wenig ausgeprägt oder fehlt vollständig. Hier war zu prüfen, ob das Schwinden der DDT-Wirkung nur dadurch vorgetäuscht wird, daß die bei Kombination von DDT und hohen DÄNA-Dosen besonders stark ausgeprägte kompensatorische Lebervergrößerung zu einer Verminderung des relativen Anteils präneoplastischer Zellareale trotz deren absoluter Zunahme führen konnte. Daher wurden aus den in einer bekannten Schnittfläche stereometrisch ermittelten Werten und dem Gewicht der entsprechenden Leber das absolute Volumen der präneoplastischen Veränderungen in der Gesamtleber errechnet. Durch diese

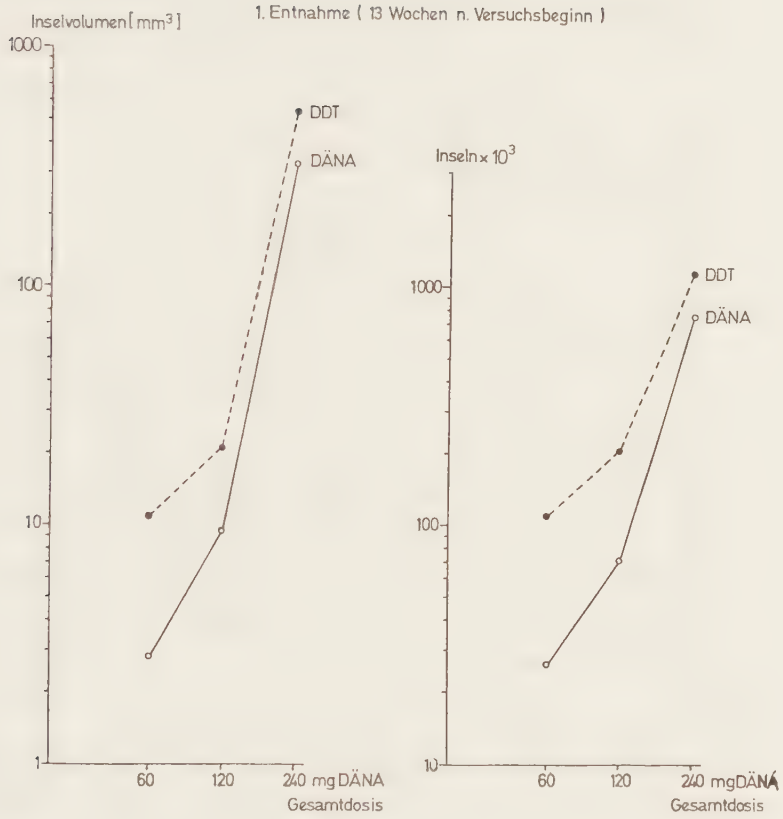


Abb. 5 Gesamtvolumen und Zahl ATPase-freier Inseln in der Gesamtleber von 100 g schweren Tieren 13 Wochen nach Versuchsbeginn. Dauer des behandlungsfreien Intervalls bei 60 mg DÄNA-Gesamtdosis 9 Wochen, bei 120 mg 7 Wochen, bei 240 mg 3 Wochen.

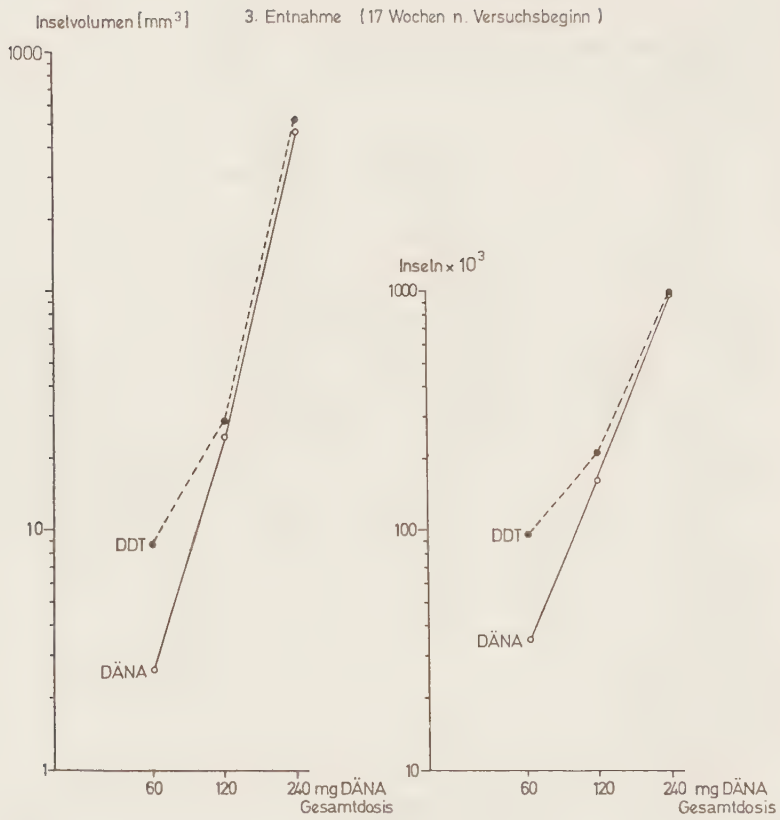


Abb. 6 Gesamtvolumen und Zahl ATPase-freier Inseln in der Gesamtleber von 100 g schweren Tieren 17 Wochen nach Versuchsbeginn. Dauer des behandlungsfreien Intervalls bei 60 mg 13 Wochen, bei 120 mg 11 Wochen, bei 240 mg DÄNA-Gesamtdosis 7 Wochen.

Korrektur ergaben sich jedoch keine erheblichen Veränderungen der vorher erhaltenen Ergebnisse. Die in Abb. 5 und 6 dargestellten Verläufe von absolutem Volumen und Inselzahl ATPase-freier Areale in der Gesamtleber stimmen mit Abb. 4a bis c prinzipiell überein.

3.3.2. Abhängigkeit von Zahl, Einzelgröße und Gesamtvolumen enzymdefekter Inseln von der Dauer des behandlungsfreien Intervalls

Die in Abb. 4a-c dargestellten Dosis-Wirkungsbeziehungen lassen vermuten, daß das Ausmaß der DDT-Wirkung von den behandlungsfreien Intervallen abhängig ist, weshalb in Abb. 7 und 8 und in Tab. 2a-c das Ausmaß der präneoplastischen Veränderungen bei gleicher DÄNA-Gesamtdosis und zunehmender Latenzzeit dargestellt sind. Im niedrigen Dosisbereich (Abb. 7) bleibt sowohl für DÄNA als auch für die Kombination mit DDT während der Zunahme der Latenzzeit von 9 auf 13 Wochen das Gesamtvolumen gleich, ebenso die Anzahl der Insel pro cm^2. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den von FREKSA et al. (1969b) gefundenen Beobachtungen. Bei der höchsten DÄNA-Gesamtdosis von 240 mg nahm das Gesamtinselvolumen zwischen der 3. und 4. Woche Latenzzeit geringfügig zu. In Kombination mit DDT schien nach 240 mg DÄNA schon nach 3 Wochen Latenzzeit die maximale präneoplastische Wirkung erreicht zu sein. Eine Umrechnung dieser Werte auf das Lebergesamtvolumen führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Relation zwischen DÄNA + DDT und Kontrollgruppen wie Abb. 9 zeigt. Für die Gesamtdosis von 120 und 240 mg DÄNA können die Werte aus Tab. 3 entnommen werden.

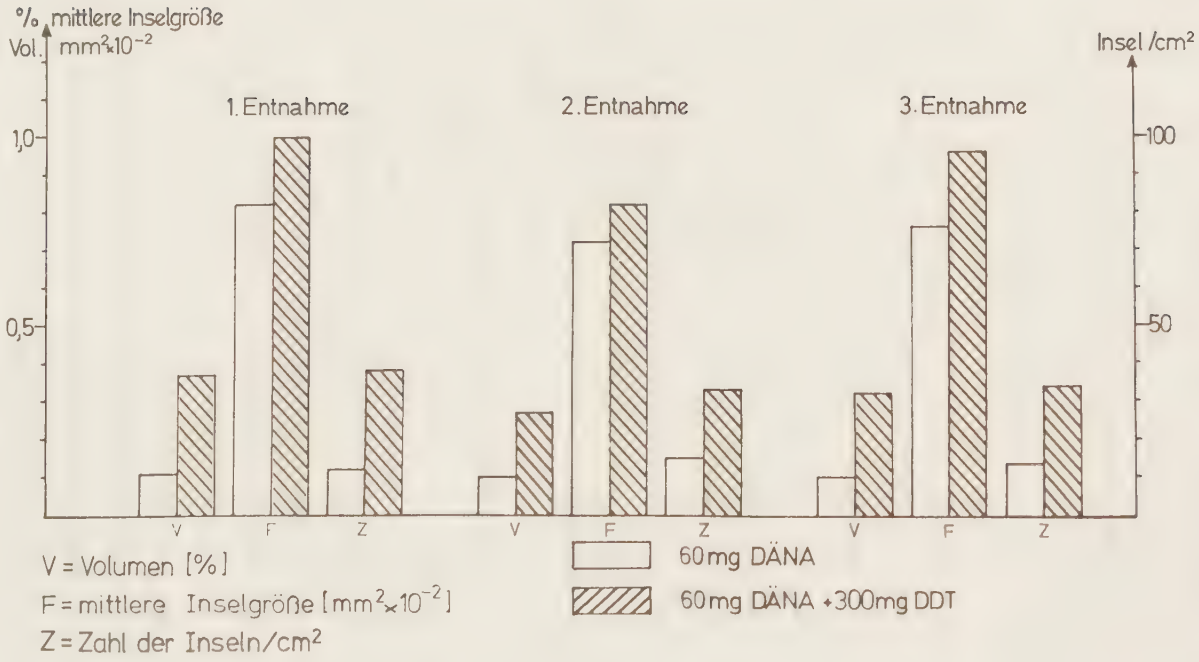


Abb. 7 Gesamtvolumen, mittlere Größe und Zahl ATPase-freier Inseln bei 60 mg DÄNA-Gesamtdosis und 9 Wochen, 11 Wochen und 13 Wochen behandlungsfreiem Intervall.

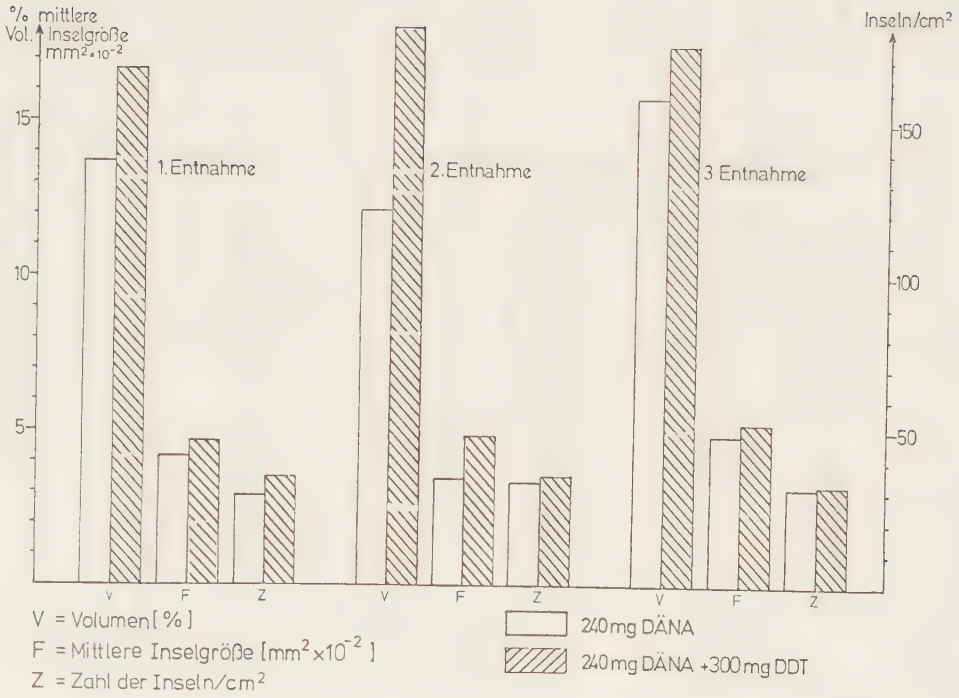


Abb. 8 Gesamtvolumen, mittlere Größe und Zahl ATPase-freier Inseln bei 240 mg DÄNA-Gesamtdosis und 3 Wochen, 5 Wochen und 7 Wochen behandlungsfreiem Intervall.

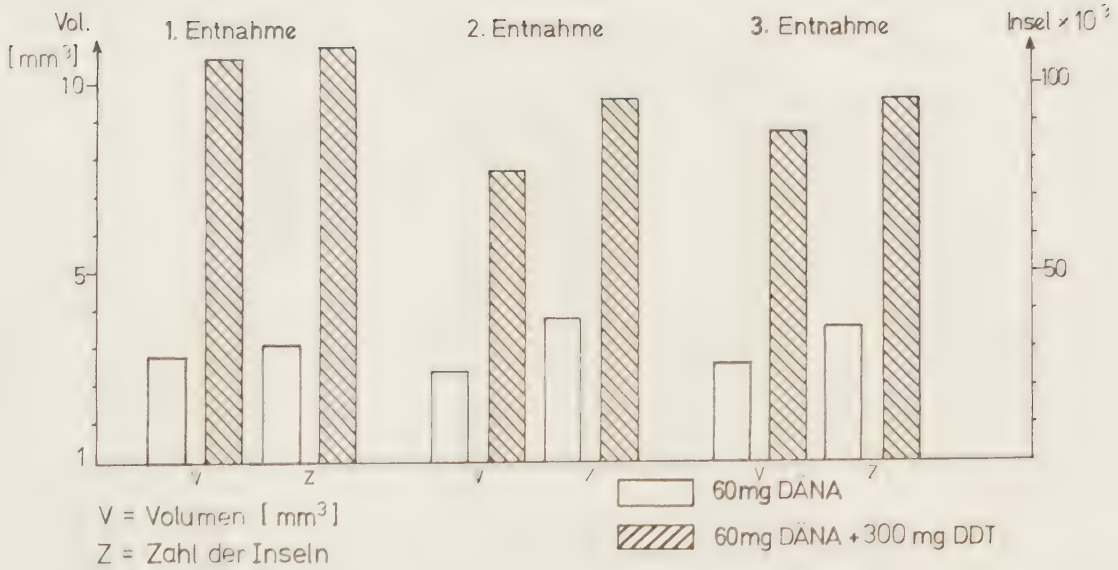


Abb. 9 Gesamtvolumen und Zahl ATPase-freier Inseln in der Gesamtleber von 100 g schweren Tieren bei 60 mg DANA-Gesamtdosis. Behandlungsfreies Intervall bei 1. Entnahme 9 Wochen, bei 2. Entnahme 11 Wochen und bei 3. Entnahme 13 Wochen.

3.4. Biochemische Ergebnisse

Das wesentliche Ergebnis der histochemischen Untersuchungen liegt in der Feststellung, daß die Steigerung präneoplastischer Veränderungen durch DDT-Induktion auf einer Vermehrung der Inselzahl und nicht auf einer Steigerung des Inselwachstums beruht. Dies läßt aufgrund der Dosis-Wirkungsbeziehungen bei Durchfütterungs- und Stoppversuchen darauf schließen, daß ein carcinogener Initialprozess und nicht die Progression transformierter Zellen gesteigert wird.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnten von TOMATIS et al. (1972) mit DDT an CF-1-Mäusen Lebertumoren induziert werden. Deshalb war zunächst daran zu denken, daß die Erhöhung präcarcinogener Veränderungen auf der Summation zweier Carcinogene mit gleicher Organotropie beruht. Diese Annahme wurde aber durch die histochemischen Untersuchungen der nur mit DDT behandelten Tiere nicht gestützt. In den Leberschnitten fanden sich hier, ebenso wie bei unbehandelten Kontrollgruppen, nur ganz vereinzelt kleine enzymfreie Inselgruppen.

Als weitere Möglichkeit war zu erwägen, ob DDT als Halogenkohlenwasserstoff, ähnlich wie Halothan, die Nitrosaminmetabolisierung beeinflußt und dadurch zur vermehrten Bildung reaktiver, alkylierender Metabolite führt (KUNZ et al., 1969). Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurden bioche-

mische Analysen des DDT-Einflusses auf die DÄNA-Metabolisierung durchgeführt.

Entsprechend der methodischen Bedingung der histochemischen Experimente wurden DÄNA und DDT isoliert und in Kombination appliziert. In der akuten Phase nach 2-tägiger Einwirkung sowie nach länger dauernder Applikation von 10 Tagen wurden die Cytochrom P450 und b5-Gehalte der Lebermikrosomen und deren Funktion durch Messung von Nitroanisoldemethylierung sowie die Formaldehydbildung und die Alkylierungsintensität bei DMNA-Zusatz beurteilt. Die auf ein mg Mikrosomenprotein bezogenen Absolutwerte von Cytochrom-Gehalten und Monooxygenasefunktionen sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Abb. 10 und 11 zeigen zur besseren Vergleichbarkeit die prozentualen Veränderungen der Versuchskollektive.

Die isolierte DDT-Applikation führt, wie erwartet, zur Erhöhung der Cytochrom P450- und b5-Gehalte und zur Steigerung aller Funktionsparameter. Dies gilt insbesondere für die Nitroanisoldemethylierung und die Formaldehydbildung aus DMNA. Die Alkylierung der mikrosomalen Makromoleküle durch ^{14}C-DMNA ist weniger stark erhöht als die Nitroanisoldemethylierung, liegt jedoch deutlich über dem Wert der Kontrollmikrosomen.

Durch kurz- und langfristige Applikation von DÄNA wurden die Cytochromgehalte nur unwesentlich beeinflußt, die Funktion wird in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer unterschiedlich beeinflußt. Bei 2-tägiger Behandlung ist die Formaldehydbildung aus DMNA geringgradig erniedrigt, nach

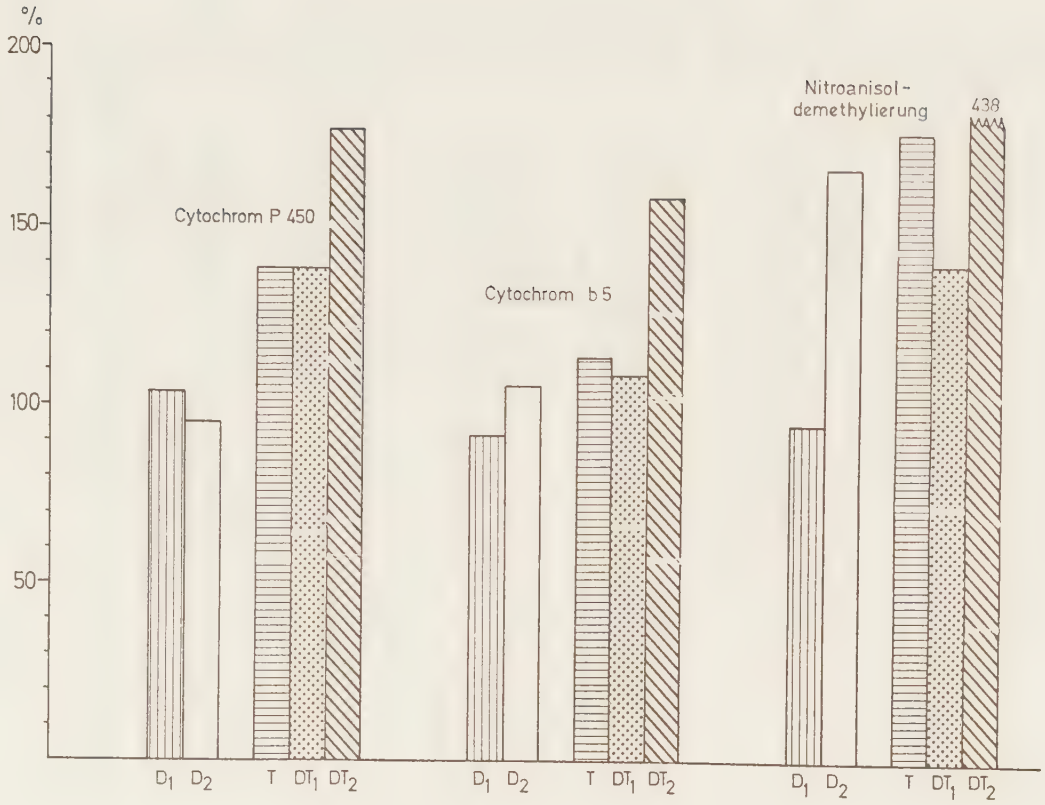


Abb. 10 Cytochromgehalte und Nitroanisoldemethylierung von Lebermikrosomen nach isolierter und kombinierter in-vivo-Vorbehandlung mit DÄNA und DDT. Symbole der Säulen siehe S. 45.
Angaben der prozentualen Veränderungen bezogen auf die Werte unbehandelter Kontrolltiere (100 %).

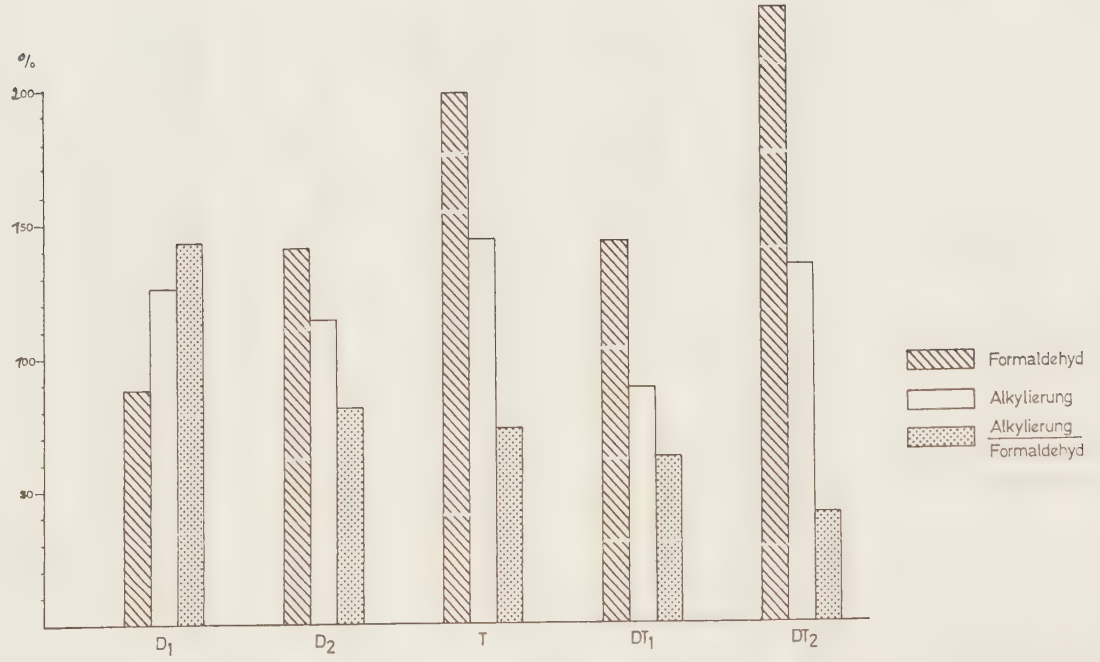


Abb. 11 Formaldehydbildung und Proteinalkylierung bei in vitro Inkubation von ^{14}C-DMNA mit Lebermikrosomen unbehandelter und in vivo vorbehandelter Ratten. Angaben der prozentualen Veränderungen bezogen auf die Werte unbehandelter Kontrolltiere. Die Untersuchungen wurden mit den gleichen Mikrosomenpräparationen durchgeführt, wie die Analysen von Abb. 10. Symbole s. S. 45.

10-tägiger Behandlung dagegen deutlich erhöht. Die Alkylierungsintensität ist zu beiden Zeitpunkten nur leicht gesteigert.

Symbole und ihre Definition:

Gruppe D_1 2 x 5 mg DÄNA kg/KG

Gruppe D_2 10 x 5 mg DÄNA kg/KG

Gruppe T 100 mg DDT kg/KG

Gruppe DT_1 2 x 5 mg DÄNA kg/KG und 100 mg DDT kg/KG

Gruppe DT_2 10 x 5 mg DÄNA kg/KG und 100 mg DDT kg/KG

Die kombinierte Applikation von DÄNA und DDT bewirkt bei kurzfristiger DÄNA-Einwirkung eine Veränderung der Cytochromgehalte und deren Funktion, die annähernd den Mittelwerten der Einzelwirkungen entsprechen. Bei 10-tägiger DÄNA-Applikation liegen die Cytochromgehalte gering, die Funktionsparameter jedoch sehr deutlich über dem Mittel der Einzelkomponenten. Die Funktionserhöhung liegt demnach hier deutlich über der Erhöhung der Cytochrom P450-Gehalte. Dies verdeutlicht Tab. 5, in der die Funktionswerte auf ein mmol P450-Gehalt bezogen sind. Die Alkylierungsintensität ist bei Bezug auf 1 mg Mikrosomenprotein gering erhöht, jedoch nicht dem Cytochrom P450-Anstieg entsprechend wie Tab. 5 zeigt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigen sicher, daß DDT den Nitrosaminstoffwechsel nicht in gleicher Weise wie Halothan beeinflußt. Die Alkylierungsrate wird zwar bei längerer DÄNA-Einwirkung erhöht, jedoch bei weitem

nicht in dem bei Halothan gefundenen Ausmaß. Noch deutlicher ist die Differenz in der Beeinflussung der α-Hydroxylierung. Einer sehr starken Hemmung durch Halothan steht eine intensive Steigerung durch DDT gegenüber. Das Verhältnis Alkylierung/Formaldehydbildung wird deshalb durch DDT stark erniedrigt, durch Halothan erhöht (APPEL, 1977). Dieses DDT-Wirkungsbild entspricht hier eher dem der anderen Induktoren Phenobarbital und Methylcholanthren. In der Beeinflussung dieses Quotienten gleicht DDT den Induktoren Phenobarbital und Methylcholanthren. Deutliche Unterschiede bestehen jedoch zwischen diesen Induktoren hinsichtlich der Absolutwerte. Auf die Bedeutung dieser Befunde wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

4. DISKUSSION

Wie in der Einleitung bereits eingehend dargelegt wurde, ist die Frage einer möglichen chronisch-toxischen und insbesondere einer carcinogenen oder co-carcinogenen Wirkung von DDT und DDT-Metaboliten wegen ihrer ubiquitären Verbreitung und ihrer auf Speicherung im Fettgewebe beruhenden, extrem langen Verweilung im Organismus von erheblichem Allgemeininteresse. Trotz umfangreicher Untersuchungen bestehen heute noch sehr unterschiedliche Ansichten. Diese Unsicherheit beruht im wesentlichen auf den widersprüchlichen Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen. Wie beschrieben, konnten bei männlichen CF-1 Mäusen durch Applikation von DDT maligne zum Teil metastasierende Lebertumoren ausgelöst werden. Bei anderen Mäusestämmen und Tiergattungen konnte dagegen keine carcinogene Wirkung beobachtet werden.

Es kann nicht entschieden werden, ob die Tumorbildung bei CF-1 Mäusen auf einer Stoffwechseleigenheit beruht, die nur diesem Stamm zuzueignen ist und deshalb nicht verallgemeinert werden kann, oder ob eine ausgeprägte Empfindlichkeit dieses Stammes eine prinzipiell vorhandene schwache Carcinogenität erkennen läßt, die mit der konventionellen Methode der Carcinogenitätsprüfung bei anderen Tierarten nicht erfaßt werden kann, weil die Tumormanifestation die mittlere Lebensdauer überschreitet. Die Lösung dieses für die Beurteilung schwach-carcinogener Substanz-

wirkungen generell geltenden, methodischen Problems kann durch folgende drei experimentelle Verfahren versucht werden:

1) Aufgrund der von DRUCKREY ermittelten Dosis-Zeit-Wirkungs-Gesetzmäßigkeiten chemisch carcinogener Substanzen ist es möglich, eine noch im üblichen Dosisbereich latente Carcinogeneinwirkung durch Dosissteigerung an einer Tumormanifestation zu erkennen. Jedoch auch bei fehlender Allgemeintoxizität kann die Anwendung extrem hoher, praktisch irrelevanter Dosen zur Fehldeutung führen. Hier besteht die Möglichkeit unspezifischer Beeinflussung von enzymatischen Entgiftungs- und Repairmechanismen, so daß reaktive Metaboliten der zu prüfenden Substanz oder andere Fremdstoffe nicht entstehen oder rasch abgebaut und eliminiert werden.
2) Eine zweite Möglichkeit zur Erfassung einer schwachcarcinogenen Substanzwirkung ergibt sich aus dem mit Syn- oder Pluricarcinogenese (HECKER, 1976) bezeichneten Prinzip, daß sich die Wirkungen von an derselben Target-Zelle angreifenden Carcinogenen verschiedener Stoffklassen addieren. Bei gleichzeitiger Applikation der Prüfsubstanz mit einer bestimmten Dosis eines bekannten Carcinogens kann auch eine schwache Carcinogenität dieser Substanz an der Wirkungssteigerung erkannt werden. Diese Möglichkeit wurde in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mitgenutzt. Fehldeutungen können sich hier jedoch ergeben, wenn die Prüf-

substanz den Aktivierungs- oder Inaktivierungsmetabolismus des Carcinogens beeinflußt, oder als Co-Carcinogen die Entwicklung von Tumorzellen promoviert. Die Erkennung derartiger die Wirksamkeit von Solitärcarcinogenen modifizierender Eigenschaften eines Stoffes ist für die praktisch-toxikologische Bewertung ebenfalls von großer Bedeutung.

3) Die dritte Methode eine schwach carcinogene Wirkung eines Stoffes durch quantitative Bestimmung praeneoplastischer Frühveränderungen zu erfassen, erlaubt gleichzeitig eine Differenzierung der eben dargestellten Interferenzwirkung. Deshalb wurde dieses Verfahren zur Beurteilung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit bevorzugt.

4.1. Kritik der angewandten Methode zur Beurteilung carcinogener Substanzwirkungen durch quantitative Bestimmung enzymdefekter Zellareale

Eingehende Analysen (WEBER und CANTERO, 1955) zahlreicher enzymdefekter Tumorzellen ergeben, daß es für maligne Zellen keine charakteristischen Enzymveränderungen gibt. In allen Tumoren fanden sich im Vergleich mit dem Matrixgewebe regellose Ausfälle zahlreicher Enzyme, deren Zahl annähernd proportional zur Wirksamkeit des Carcinogens, seiner Dosis und Einwirkungszeit ansteigt. Am Beispiel histochemisch nachweisbarer Enzyme (Glucose-6-phosphatase und ATPase) konnten die Arbeitsgruppen FREKSA et al. (1969a,

b), SCHAUER et al. (1968) zeigen, daß sich die Enzymdefekte von chemisch induzierten Lebertumoren schon sehr frühzeitig und nach Applikation geringer Carcinogendosen in Einzelzellen und kleineren Zellgruppen finden. Durch Teilung entstehen daraus sich stetig vergrößernde, enzymdefekte Inseln, die sich vom Parenchym scharf abgrenzen. Beim histochemischen Nachweis dieser Enzymdefekte finden sich in Parallelschnitten Zellgruppen, in denen lediglich ein Enzym isoliert fehlt und Areale mit Ausfall mehrerer Enzymaktivitäten gleichzeitig. Mit Zunahme der Carcinogendosis und Einwirkungszeit steigt die Koinzidenz dieser Enzymdefekte kontinuierlich an und beträgt nach SCHIEFERSTEIN et al. (1974) bei Inseln von mehr als 500 µ Durchmesser nahezu 100 %.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Ausfälle der Enzyme keine kausale Bedeutung für die Tumorbildung besitzen. Sie sind offenbar Folge somatischer Mutationen, die durch das Carcinogen ausgelöst werden. Zwischen den durch Anwendung histochemischer Methoden erkennbaren Mutationen und dem Ausfall der Zellwachstum und Zellteilung regulierender Systeme besteht demnach eine statistische Korrelation. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese die Zellvermehrung steuernden Genorte getroffen werden, steigt mit zunehmender Anzahl der Treffer in einer Zelle und damit proportional zur Zahl der Enzymdefekte an. DRUCKREY schließt aus dem steilen Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung chemischer Carcinogene, daß für die Trans-

formation einer Zelle mehr als 100 Genorte getroffen werden müssen (DRUCKREY et al., 1962).

Diese trefferstatistischen Gesetzmäßigkeiten stehen in Einklang mit den empirisch gefundenen quantitativen Beziehungen zwischen Carcinogendosis, Applikationsdauer, Zahl und Gesamtvolumen der praeneoplastischen Veränderungen sowie Manifestationszeit und Zahl der induzierten Tumoren. Danach ist die Zahl enzymdefekter Inseln eine Funktion der Carcinogendosis, das Wachstum der Einzelinseln eine Funktion der Einwirkungszeit und das Gesamtvolumen entspricht dem Produkt beider Größen.

Bei kontinuierlicher Carcinogenapplikation in einem bestimmten Dosisbereich steigt die Zahl und das Gesamtvolumen der Inseln bei Aufzeichnung im doppel-logarithmischen Netz linear mit verschiedenen Steigungswinkeln an, die steilste Progression besitzt das Gesamtvolumen. Da dessen Bestimmung auch meßtechnisch am leichtesten zu erfassen ist und die geringste Schwankungsbreite besitzt, ist für die Analyse der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung dieses am besten geeignet.

Bei Applikation verschiedener Einzeldosen werden parallel verlaufende Regressionsgeraden erhalten. Wird dabei das Erreichen der im linearen Bereich zwischen 0.1 und 10 % liegenden Inselfläche von 1 % als Wirkungsparameter betrachtet und die Zeit bestimmt, die bis zum Erreichen dieser Größe notwendig ist, so ergeben sich die gleichen

Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen, die DRUCKREY aufgrund der Wirkungsparameter Tumorbildung oder Tumortod ermittelt hat. Aus Abb. 12 ist ersichtlich, daß die Dosis-Zeit-Kurve des Entstehens definierter enzymdefekter Inselareale parallel zur Dosis-Zeit-Geraden der Tumorbildung verläuft. Wesentlich ist für die Anwendbarkeit der Methode der daraus erbrachte Nachweis, daß zumindest für DÄNA die Ausbildung präneoplastischer Veränderungen den gleichen Gesetzmäßigkeiten folgt wie die Tumorbildung. Es ist deshalb erlaubt, aus diesen präcancerösen Veränderungen Rückschlüsse auf die Carcinogenität einer Substanz zu machen.

4.2. Beeinflussung der durch DÄNA induzierten präneoplastischen Veränderungen durch DDT

Durch simultane Applikation von DDT wurde das Volumen enzymdefekter Zellareale in allen Versuchsreihen gesteigert, wobei die größte Differenz im niedrigsten Dosisbereich (DÄNA-Gesamtdosis 60 mg/kg) gefunden wurde. Die Steigerung des Inselvolumens entspricht der Zunahme der Inselzahl, während die Größe der Einzelinseln annähernd denen der Kontrollgruppe gleich blieb. Nach den oben beschriebenen Analysen war daraus auf eine Steigerung der Carcinogenwirkung zu schließen und nicht auf ein beschleunigtes Wachstum der transformierten Zellen. Dieses Ergebnis war unerwartet, da bei simultaner Applikation anderer das Monooxygenasesystem induzierender Substanzen wie Phenobarbital oder Methylcholanthren umgekehrt eine signifikante Herab-

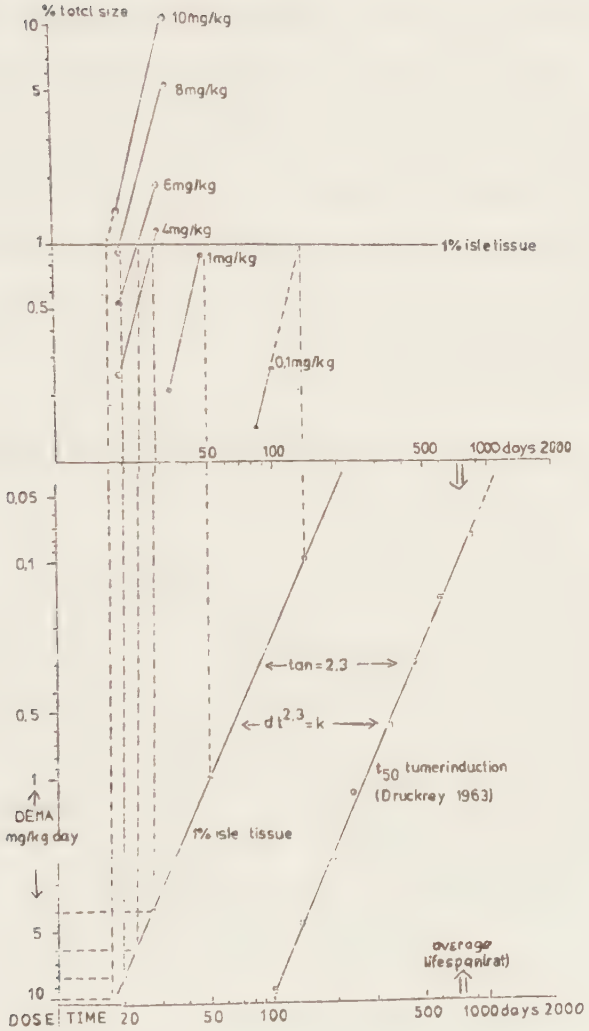


Abb. 12 Graphische Darstellung der Dosis-Zeit-Gesetzmäßigkeiten von praeneoplastischen Zellarealen und manifesten Lebertumoren nach Applikation von DÄNA. Erklärung der Darstellung Seite 52 nach KUNZ et al. (1978).

setzung der praeneoplastischen Veränderungen gefunden wurde. Da nach allen bekannten Untersuchungen die Cytochrom P450-Funktion durch DDT in gleicher Weise wie durch Phenobarbital beeinflußt wird (McLEAN et al., 1977), war es naheliegend, als Ursache der kontroversen DDT-Wirkung andere Prinzipien anzunehmen. Da, wie schon diskutiert, eine schwach-carcinogene Eigenwirkung von DDT möglich schien, war zunächst diese Überlegung durch isolierte DDT-Behandlung zu prüfen.

4.3. Zahl und Volumen praeneoplastischer Veränderungen unter isolierter DDT-Applikation

Da Zahl und Volumen enzymdefekter Inseln unter DDT-Behandlung ähnlich denen unbehandelter Kontrolltiere waren, war als deren Ursache der sehr unterschiedliche Gehalt des Futters an hepatocarcinogenen Substanzen anzusehen. Von KANN et al. (1977) wurde in den kommerziell erhältlichen Versuchstierfuttermitteln Dimethylnitrosamin in Konzentrationen von 1-79 µg/kg nachgewiesen. Die in vorliegender Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen sicher, daß DDT keine carcinogene Eigenwirkung besitzt, die eine Steigerung der durch DÄNA induzierten praeneoplastischen Veränderungen erklären könnte.

4.4. Zelluläre Veränderungen unter DDT-Behandlung

Als weitere Erklärungsmöglichkeit war in Betracht zu ziehen, daß DDT in angewandter Dosierung zu deutlicher Zellhypertrophie und -hyperplasie führte und somit eine

vermehrte DNA-Synthese zur Folge hat, wodurch Zellen durch Carcinogene leichter transformiert werden können. Mehrere Autoren (CRADDOCK, 1971, 1976; SCHERER et al., 1975) konnten zeigen, daß durch einmalige Applikation von Carcinogendosen, die bei Kontrolltieren nicht zur Tumormanifestation in der Leber führten, in der sich regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie Tumoren induziert wurden. Hierbei war die Tumorausbeute in der Leber bei Carcinogengabe zum Zeitpunkt der höchsten DNA-Syntheseaktivität, 24 Stunden nach Teilhepatektomie, am größten.

Ob die erhöhte Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber Carcinogenen für die Steigerung der praeneoplastischen Veränderungen verantwortlich ist, muß vorerst noch offen bleiben. DDT führt vor allem unmittelbar nach Applikation durch Zellteilung und Zellwachstum zur Lebervergrößerung. Zum Zeitpunkt der ersten DÄNA-Applikation nach 14-tägiger DDT-Einwirkung ist der Vergrößerungsprozeß weitgehend abgeschlossen und das steady state erreicht. Da die Lebergewichtskurve der simultan mit DDT und DÄNA behandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt intensiv anstieg, kann diese Möglichkeit erst durch zellkinetische Analysen beurteilt werden.

4.5. Einfluß von DDT auf das Wachstum transformierter Zellen

Außer der erhöhten Empfindsamkeit sich teilender Zellen durch DDT-Vorbehandlung könnte auch die nachgewiesene Promotion präcanceröser Zellen durch zellteilungsauslösen-

de Mechanismen für die DDT-Wirkung von Bedeutung sein.

Phenobarbital senkt bei simultaner Applikation mit einem Carcinogen die Tumorrate (PERAINO et al., 1971), führt jedoch bei Zufuhr unmittelbar nach Absetzen des Carcinogens zur Zunahme praeneoplastischer Herde und Tumorzellen (KITAGAWA et al., 1977). Bei Analyse enzymdefekter Zellareale ließ sich eindeutig zeigen, daß durch Nachbehandlung mit Phenobarbital, das Zellwachstum und Zellvergrößerung auslöst, die Zahl enzymfreier Herde erheblich zunahm, während sie bei Kontrolltieren nach Absetzen konstant blieb oder leicht absank. Unter diesen Bedingungen sprechen die ermittelten Befunde für eine promovierende Wirkung der Induktionssubstanz.

Wegen der lange anhaltenden Speicherung von DDT im Körperfett ist hier sicher damit zu rechnen, daß nach Absetzen von DÄNA die DDT-Wirkung auch während der folgenden Lebenszeit noch vorhanden ist. Es erhebt sich allerdings auch hier die bereits oben diskutierte Frage, ob die Zellteilungsvorgänge bei protrahierter DDT-Einwirkung noch stimuliert werden.

4.6. Beeinflussung des Carcinogenmetabolismus durch DDT

Obwohl DDT die Monooxygenasefunktion in gleicher Weise wie Phenobarbital beeinflußt, war zu prüfen, ob die Metabolisierung von DÄNA in gleicher Weise beeinflußt wird. Weiterhin war zu untersuchen, ob sich bei langer und gleichzeitiger Einwirkung von DÄNA und DDT die gleichen Verän-

derungen finden, wie bei der fast ausschließlich untersuchten akuten Einwirkung.

Die gefundenen Ergebnisse zeigen, daß DDT keine derartig extreme Steigerung der Alkylierung wie Halothan hervorruft, daß es jedoch vom üblichen Wirkungsbild der Induktoren Phenobarbital und Methylcholanthren abweicht. Diese Befunde könnten ein Hinweis dafür sein, daß Dialkylnitrosamine durch verschiedene P450-Spezies mit unterschiedlicher Affinität und Umsatzgeschwindigkeit metabolisiert werden, deren Anteil unter Einwirkung differenter Induktoren variiert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die noch umstrittene Frage einer möglichen, schwach carcinogenen oder co-carcinogenen Wirkung von DDT zu beurteilen. Dazu wurden DDT (3 x 100 mg/kg) und DÄNA (5 mg/kg/die) alleine sowie in Kombination Kollektiven von weiblichen Wistar-Ratten verabreicht. Die DÄNA-Applikationsdauer betrug 2, 4 und 8 Wochen. Als empfindlicher Parameter der carcinogenen Wirkung wurden Zahl und Größe irreversibel ATPase-defekter Zellherde unter Anwendung verschiedener Methoden der quantitativen Bildanalyse bestimmt. Zur Beurteilung der Resultate wurden in vergleichbar behandelten Kollektiven Gehalt und Funktion des mikrosomalen Monooxygenasesystems sowie Metabolismus und Alkylierungsintensität von ^{14}C-DMNA bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1) Bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Methoden der quantitativen Bildanalyse erwiesen sich die Integrationsverfahren für Routineuntersuchungen den Planimetrieverfahren wegen ihrer arbeitstechnischen Vorteile bei gleicher Genauigkeit überlegen. Die in der Arbeit verwerteten Ergebnisse wurden unter Verwendung der Integrationsplatte II der Fa. Zeiss, Oberkochen ermittelt.
2) Nach Applikation von DÄNA steigen prozentuales Gesamtinselvolumen und Inselzahl bei Aufzeichnung im doppel-

logarithmischen Koordinatensystem innerhalb eines Volumenanteils von 0.1 bis etwa 10 % linear an und verlaufen anschließend asymtotisch.

3) Durch simultane DDT-Applikation wird das Gesamtvolumen enzymdefekter, praeneoplastischer Herde signifikant erhöht. Diese Erhöhung ist bei Applikation niedriger DÄNA-Gesamtdosen (60 mg/kg) besonders ausgeprägt. Die geringer werdende Wirkungssteigerung bei hohen DÄNA-Gesamtdosen (240 mg/kg) wird auf das Erreichen hoher, nicht mehr im linearen Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung liegender Inselgrößen zurückgeführt.

4) Die Erhöhung des Gesamtinselvolumens durch DDT beruht überwiegend auf einer signifikanten Erhöhung der Inselzahl, während das mittlere Volumen der Einzelinsel nur geringfügig gesteigert ist. Demnach ist eine Steigerung der Initiation aufgrund einer vermehrten Bildung reaktiver Carcinogenmoleküle oder eine erhöhte Promotion anzunehmen und nicht ein beschleunigtes Wachstum der schon transformierten Zellen.

5) Bei isolierter Applikation von DDT werden nur wie bei unbehandelten Kontrolltieren ganz vereinzelt sehr kleine enzymdefekte Zellherde gefunden. Die deutliche Erhöhung der durch DÄNA induzierten präcancerösen Veränderungen bei simultaner DDT-Applikation ist daher sicher nicht das Ergebnis einer syncarcinogenen Wirkung. Eine Eigencarcinogenität von DDT kann demnach unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

6) Zur Prüfung der Möglichkeit, daß DDT als Halogenkohlenwasserstoff - änlich dem Halothan - die Bildung der alkylierenden DMNA-Metaboliten steigert, wurden biochemische Analysen von Gehalt und Funktion des Monooxygenasesystems durchgeführt. Nach DDT-Induktion sind die Cytochrom P450- und b5-Gehalte stark erhöht und entsprechend gesteigert sind ihre Funktion, gemessen an der α-Hydroxylierung und Nitroanisoldemethylierung. Die Alkylierungsintensität lag zwar gering über den Kontrollwerten, jedoch nicht in einem Ausmaß, das die Steigerung praeneoplastischer Veränderungen erklären könnte. Das Induktionsspektrum entspricht demnach annähernd dem von Phenobarbital und Methylcholanthren. Eine den Haloalkanen analoge Steigerung der Bildung reaktiver DÄNA Metaboliten durch DDT ist als Ursache der Zunahme praeneoplastischer Veränderungen ebenfalls auszuschließen.

7) Es ist anzunehmen, daß die Steigerung nitrosamin-induzierter Praeneoplasien bei DDT-Einwirkung auf einer erhöhten Ansprechbarkeit des Matrixgewebes und vor allem auf der Promotion praeneoplastischer Zellen aufgrund der langandauernden, leberwachstumsstimulierenden Wirkung von DDT beruht.

Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel-fläche ($mm^2 \cdot 10^{-2}$)	Inseln/ cm^2	P	Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel fläche ($mm^2 \cdot 10^{-2}$)	Inseln/ cm^2
D_2-I	0.14	1.29	10		DT_2-I	0.39	1.1	35.8
D_2-II	0.06	0.46	11.9		DT_2-II	0.34	1.11	30.38
D_2-III	0.14	0.92	15.1		DT_2-III	0.39	0.82	47.74
$\bar{M}$	0.11	0.82	12.3	<0.001	$\bar{M}$	0.37	1.01	37.97
D_4-I	0.27	1.33	21.70		DT_4-I	0.64	1.10	57.50
D_4-II	0.38	1.47	27.12		DT_4-II	0.60	0.83	71.50
D_4-III	0.45	1.26	35.47		DT_4-III	1.13	1.10	100.90
$\bar{M}$	0.36	1.46	27.12	<0.005	$\bar{M}$	0.80	1.01	76.67
D_8-I	11.20	4.11	270.16		DT_8-I	17.60	4.94	354.79
D_8-II	13.50	4.26	316.82		DT_8-II	17.10	4.71	362.39
D_8-III	13.50	4.45	302.71		DT_8-III	15.60	4.52	345.03
$\bar{M}$	12.73	4.27	296.56	<0.001	$\bar{M}$	16.67	4.72	354.07

Tabelle 2a: Enzymdefekte der 1. Entnahme 13 Wochen nach Versuchsbeginn.
Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist für das Inselvolumen berechnet.

Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel-fläche ($mm^2 \cdot 10^{-2}$)	Inseln/ cm^2	P	Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel-fläche ($mm^2 \cdot 10^{-2}$)	Inseln/ cm^2
D_2-IV	0.11	0.83	14.10		DT_2-IV	0.33	0.76	43.40
D_2-V	0.13	0.64	21.70		DT_2-V	0.17	0.92	18.44
D_2-VI	0.07	0.69	10.85		DT_2-VI	0.31	0.78	39.06
$\bar{M}$	0.1	0.72	15.55	<0.01	$\bar{M}$	0.27	0.82	33.63
D_4-IV	1.83	2.12	85.17		DT_4-IV	2.19	2.08	105.24
D_4-V	0.64	1.30	48.82		DT_4-V	1.01	1.41	71.61
D_4-VI	0.59	1.10	55.16		DT_4-VI	0.68	1.06	64.01
$\bar{M}$	1.02	1.50	62.38	<0.7	$\bar{M}$	1.29	1.51	80.28
D_8-IV	11.14	3.94	282.10		DT_8-IV	21.48	5.71	375.41
D_8-V	12.46	3.42	363.47		DT_8-V	20.43	5.28	383.00
D_8-VI	12.74	3.37	377.58		DT_8-VI	12.78	3.92	325.50
$\bar{M}$	12.11	3.57	341.05	<0.005	$\bar{M}$	18.16	4.97	361.30

Tabelle 2b: Enzymdefekte der 2. Entnahme 15 Wochen nach Versuchsbeginn.
Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist für das Inselvolumen berechnet.

Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel-Fläche ($mm^2.10^{-2}$)	Inseln/ cm^2	P	Gruppe/ Tier	Inselvolumen in %	Mittlere Insel-Fläche ($mm^2.10^{-2}$)	Inseln/ cm^2
D_2-VII	0.15	1,05	14.21		DT_2-VII	0.43	0.92	46.65
D_2-VIII	0.09	0.61	14.10		DT_2-VIII	0.22	0.82	26.79
D_2-IX	0.08	0.63	11.93		DT_2-IX	0.33	1.15	28.64
$\bar{M}$	0.10	0.76	13.41	0.001	$\bar{M}$	0.32	0.96	34.02
D_4-VII	0.72	1.34	53.16		DT_4-VII	1.54	2.05	74.86
D_4-VIII	1.00	1.64	60.76		DT_4-VIII	0.66	0.99	66.18
D_4-IX	1.18	1.57	74.86		DT_4-IX	0.73	0.98	73.78
$\bar{M}$	0.96	1.51	62.92	0.98	$\bar{M}$	0.97	1.34	71.61
D_8-VII	12.75	4.70	271.25		DT_8-VII	16.72	5.62	297.29
D_8-VIII	14.04	4.25	329.84		DT_8-VIII	21.65	5.63	384.09
D_8-IX	20.79	5.80	358.05		DT_8-IX	14.15	4.80	294.03
$\bar{M}$	15.86	4.91	391.71	0.4	$\bar{M}$	17.50	5.35	325.13

Tabelle 2c: Enzymdefekte der 3. Entnahme 17 Wochen nach Versuchsbeginn.
Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist für das Inselvolumen berechnet.

Gruppe/ Tier	Inselvolumen (mm^3)	Inseln $\cdot 10^3$	Gruppe/ Tier	Inselvolumen (mm^3)	Inseln $\cdot 10^3$
D_2-I	3.6	26.1	DT_2-I	10.3	94.1
D_2-II	1.6	31.9	DT_2-II	9.9	88.1
D_2-III	3.0	35.3	DT_2-III	12.3	151.3
$\bar{M}$	2.8	31.3	$\bar{M}$	10.7	110.1
D_4-I	6.9	54.1	DT_4-I	17.7	159.2
D_4-II	8.5	68.6	DT_4-II	14.8	176.8
D_4-III	12.9	101.7	DT_4-III	32.8	293.6
$\bar{M}$	9.6	72.1	$\bar{M}$	21.7	207.7
D_8-I	304.6	734.8	DT_8-I	591.3	1192.0
D_8-II	344.2	807.8	DT_8-II	540.3	1145.1
D_8-III	357.7	802.1	DT_8-III	492.9	1090.2
$\bar{M}$	336.0	782.9	$\bar{M}$	540.7	1142.4
D_2-IV	2.7	34.4	DT_2-IV	9.6	125.8
D_2-V	3.1	52.3	DT_2-V	4.9	53.1
D_2-VI	1.7	26.8	DT_2-VI	8.7	109.7
$\bar{M}$	2.4	37.9	$\bar{M}$	7.7	96.2
D_4-IV	44.8	208.6	DT_4-IV	64.6	310.4
D_4-V	17.0	130.3	DT_4-V	28.9	205.5
D_4-VI	15.4	143.9	DT_4-VI	20.2	190.1
$\bar{M}$	26.2	160.3	$\bar{M}$	37.8	235.2
D_8-IV	338.6	857.5	DT_8-IV	726.0	1268.8
D_8-V	426.1	1243.0	DT_8-V	629.1	1191.1
D_8-VI	384.7	1140.2	DT_8-VI	430.6	1098.9
$\bar{M}$	382.6	1077.7	$\bar{M}$	596.8	1187.4

Gruppe/ Tier	Inselvolumen (mm^3)	Inseln $\cdot 10^3$	Gruppe/ Tier	Inselvolumen (mm^3)	Inseln $\cdot 10^3$
D_2-VII	3.8	36.5	DT_2-VII	11.7	127.3
D_2-VIII	2.7	41.5	DT_2-VIII	5.8	71.2
D_2-IX	1.9	28.8	DT_2-IX	9.3	80.7
$\bar{M}$	2.6	35.4	$\bar{M}$	8.7	95.9
D_4-VII	18.4	136.0	DT_4-VII	44.3	215.5
D_4-VIII	25.9	157.3	DT_4-VIII	19.4	194.5
D_4-IX	29.1	184.9	DT_4-IX	21.7	219.8
$\bar{M}$	24.3	159.8	$\bar{M}$	28.5	210.0
D_8-VII	397.8	846.3	DT_8-VII	521.6	927.5
D_8-VIII	415.5	976.3	DT_8-VIII	671.1	1190.6
D_8-IX	613.3	1056.2	DT_8-IX	397.6	826.2
$\bar{M}$	477.3	962.3	$\bar{M}$	526.7	978.6

Tabelle 3 Enzymdefekte in der Gesamtleber 100 g schwerer Tiere für alle drei Entnahmen. Nähere Angaben siehe Legenden der Abb. 5 und 6 sowie Text S. 37

Gruppe	Cytochrom P450 nmol/mg Protein	Δ %	Cytochrom b_5 nmol/mg Protein	Δ %	Nitroanisol-demethylierung nmol/mg Protein min $\cdot 10^3$	Δ %	Formaldehyd-bildung nmol/mg Protein min	Δ %	Alkylierung dpm/mg Protein	Δ %	Alkylierung Formaldehyd	Δ %
Kontrolle	0.619	100	0.621	100	0.698	100	2.15	100	1886	100	877	100
T	0.861	+39	0.709	+14	1.237	+77	4.28	+99	2711	+44	634	-27
D_1	0.644	+ 4	0.570	- 8	0.663	- 5	1.89	+12	2368	+26	1253	+43
D_2	0.591	-45	0.659	+ 6	1.164	+67	3.02	+41	2148	+14	711	-19
DT_1	0.859	+39	0.678	+ 9	0.975	+40	3.08	+43	1662	-12	540	-38
DT_2	1.103	+78	0.989	+59	3.059	+338	7.085	+230	2525	+34	356	-59

Tabelle 4 Cytochromgehalte und metabolische in vitro Funktionen von Lebermikrosomen unbehandelter und in vivo vorbehandelter Ratten.

Bedingungen der in vitro-Versuche s. S. 12

Symbole: T = 100 mg DDT/kg
D_1 = 2 x 5 mg DÄNA/kg
D_2 = 10 x 5 mg DÄNA/kg
DT_1 = 100 mg DDT/kg + 2 x 5 mg DÄNA/kg
DT_2 = 100 mg DDT/kg + 10 x 5 mg DÄNA/kg

Gruppe	Nitroanisoldemethylierung nmol/mg Protein min $\cdot 10^3$	Δ %	Formaldehydbildung nmol/mg Protein min $\cdot 10^3$	Δ %	Alkylierung dpm/mg Protein	Δ %
Kontrolle	1.128	100	3.47	100	3.05	100
T	1.43	+27	4.96	+43	3.15	+ 3
D_1	1.03	- 9	2.93	-16	3.68	+21
D_2	1.97	+75	5.11	+47	3.63	+19
DT_1	1.14	+ 1	3.58	+ 3	1.94	-36
DT_2	2.77	+146	6.42	+85	2.29	-25

Tabelle 5 Nitroanisoldemethylierung, Formaldehydbildung sowie Alkylierung bezogen auf 1 nmol Cytochrom P450 (Symbole s. Tab. 4).

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, L.E., McCLURE, W.O.: An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power. Analyt.Biochem. 51, 173-179 (1973)

APPEL, K.E.: Bedeutung der Cytochrom P450-Funktion für Metabolismus, Alkylierungsintensität und carcinogenen Wirksamkeit von Dimethylnitrosamin. Diss. Universität Tübingen (1977)

BAILEY, S., BUNYAN, P.J., RENNISON, B.D. und TAYLOR, A.: The metabolism of 1,1-Di(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane and 1,1-Di(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane in the pigeon. Toxicology and applied Pharmacology 14, 13-22 (1969)

BARTSCH, G, FISCHER, E. und ROHR, H.P.: Ultrastructural analysis of the rat prostate (ventral lobe). Urol. Res. 3, 1-11 (1975)

BÜHLER, M.: Persönliche Mitteilung (1975)

CONNEY, A.H., WELCH, R.M., KUNTZMAN, R. und BURNS, J.J.: Commentary: Effects of pesticides on drug and steroid metabolism. Clin.Pharmacol.Therap. 8, 2-10 (1967)

CRADDOCK, V.M.: Liver carcinomas induced in rats by single administration of dimethylnitrosamine after partial hepatectomy. J.Nat.Cancer Inst. 47 No. 4, 899-905 (1971)

CRADDOCK, V.M.: Replication and repair of DNA in liver of rats treated with dimethylnitrosamine and with methyl methanesulphonate. In: Fundamentals in Cancer Prevention, P.N. Magee et al. (eds.), Univ. of Tokyo Press/Univ. Park Press, Baltimore, pp 293-311 (1976)

CZYGAN, P., GREIM, H., GARRO, A., SCHAFFNER, F. and POPPER, H.: The effect of dietary protein deficiency on the ability of isolated hepatic microsomes to alter the mutagenicity of a primary and a secondary carcinogen. Cancer Res. 34, 119-123 (1974)

DEICHMANN, W.B.: The debate on DDT. Arch.Toxikol. 29, 1-27 (1972)

DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen. Hrsg. Geigy, J.R., A.G., Pharmazeutische Abt. Basel, 6. Aufl. (1960)

DRUCKREY, H., SCHMÄHL, D., DISCHLER, W. und SCHILDBACH, A.: Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung. Naturwissenschaften 49, 217-228 (1962)

DURHAM, W.F.: Body burden of pesticides in man. Ann.N.Y. Acad.Sci. 160, 183-195 (1969)

DUTTON, A.H., HEATH, D.F.: The preparation of ^{14}C-dimethylamine and ^{14}C-dimethylnitrosamine. J.Chem.Soc. Part II, 1892 (1956)

FARBER, E.: Carcinogenesis cellular evolution as a unifying thread: Presidential adress. Cancer Res. 33, 2537-2550 (1973)

FRIEDRICH-FREKSA, H., GÖSSNER, W. und BÖRNER, P.: Histochemische Untersuchungen der Carcinogenese in der Rattenleber nach Dauergabe von Diäthylnitrosamin. Z.Krebsforsch. 72, 226-239 (1969a)

FRIEDRICH-FREKSA, H., PAPADOPULU, G. und GÖSSNER, W.: Histochemische Untersuchungen der Carcinogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. Z.Krebsforsch. 72, 240-253 (1969b)

GREIM, H., REMMER, H.: Die Wirkung von DDT und Phenobarbital auf mikrosomale hydroxylierende Cytochrome. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Parhamk.exp.Path. 255, 16-17 (1966)

GREIM, H., UBERBERG, H. und REMMER, H.: Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums durch Phenobarbital und DDT. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 257, 24-25 (1967)

GREIM, H.: Therapeutische Möglichkeiten durch die Induzierbarkeit arzneimittelabbauender Enzyme. Dtsch.Med. Wschr. 95, 196-199 (1970)

HECKER, E.: Special Report: Definitions and terminology in cancer(tumor)etiology - An analysis aiming at proposals for a current internationally standardized terminology. Int.J.Cancer 18, 122-129 (1976)

KANN, J., SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, G. and PREUSSMANN, R.: Occurence of volatile n-nitrosamines in animal diets. Z.Krebsforsch. 90, 321-323 (1977)

KITAGAWA, T., SUGANO, H.: Enhancement of azo-dye hepatocarcinogenesis with dietary phenobarbital in rats. Gann 68, 255-256 (1977)

KUNZ, W., SCHAUDE, G., SCHMID, W. and SIESS, M.: Stimulation of liver growth by drugs. I. Morphological analysis. In: Experimental Study of the Effects of the liver. Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity. Excerpta Medica Intern. Congr. Series No. 115, 113-137. Meeting in Rome, Italy (1966)

KUNZ, W., SCHAUDE, G. und THOMAS, C.: Die Beeinflussung der Nitrosamincarcinogenese durch Phenobarbital und Halogenkohlenwasserstoffe. Z.Krebsforsch. 72, 291-304 (1969)

KUNZ, W., APPEL, K., RICKART, R., SCHWARZ, M. and STÖCKLE, G.: Enhancement and inhibition of carcinogeneic effectiveness of nitrosamines. In: Primary Liver Tumors. Remmer, H., MTP Press Ltd., Lancester, U.K. in press

LOWRY, O.H., BROUGH, N.J.R., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

McLEAN, A.E.M. and McLEAN, E.K.: The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. Biochem.J. 100, 564-571 (1966)

McLEAN, A.E.M., MARSHALL, A.: Reduced carcinogenic effects of aflatoxine in rats given phenobarbitone. Br.J. exp.Path. 52, 322-329 (1971)

McLEAN, A.E.M., DRIVES, H.E.: Combined effects of low dosis of DDT and phenobarbital on cytochrom P450 and amidopyrine demethylation. Biochem.Pharmacol. 26, 1299-1302 (1977)

MILLER, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: An overview-G.H.A. Clowes memorial lecture. Cancer Res. 30, 559-576 (1970)

NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem.J. 55, 416 (1953)

OMURA, T., SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J.Biol.Chem. 239, 2379-2385 (1964)

ORTEGA, P., HAYES, W.J., DURHAM, W.F. and MATTSON, A.: DDT in the diet of the rat. Public Health Monograph No. 43, United States Government Printing Office, Washington (1956)

PERAINO, C., FRY, R.J.M. and STAFFELDT, E.: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 31, 1506-1512 (1971)

POPPER, H., CZYGAN, P., GREIM, H., SCHAFFNER, F. and GARRO, A.J.: Mutagenicity of primary and secondary carcinogens altered by normal and induced hepatic microsomes. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142, 727-729 (1973)

REMMER, H., MERKER, H.-J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin.Wschr. 41, 276-283 (1963)

REMMER, H., MERKER, H.-J.: Metabolic aspects of the toxicity of drugs. Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug-metabolizing enzymes. Ann.N.Y.Acad.Sci. 133, 79-97 (1965)

REMMER, H.: Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endoplasmatischen Reticulum der Leberzelle durch Pharmaka. Dtsch.Klin.Wschr. 44, 2001-2008 (1967)

RITTER, C., DiSTEFANO, H.S. and FARAH, A.: A method of the cytophotometric estimation of ribonucleic acid. J.Histochem.Cytochem. 9, 97-102 (1961)

ROHR, H.P., OBERHOLZER, M., BARTSCH, G. and KELLER, M.: Morphometry in experimental pathology: Methods, baseline data, and applications. Int.Rev.Exp.Path. 15, 233-325 (1976)

SCHAUER, A., KUNZE, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch. 70, 252-266 (1968)

SCHERER, E., HOFFMANN, M., EMMELOT, P. and FRIEDRICH-FREKSA, H.: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. J.Nat.Cancer Inst. 49, 93-106 (1972)

SCHERER, E., EMMELOT, P.: Foci of altered liver cells induced by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy: Their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat. Eur.J.Cancer 11, 145-154 (1975)

SCHIEFERSTEIN, G., PIRSCHEL, J., FRANK, W. und FRIEDRICH-FREKSA, H.: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin. Z.Krebsforsch. 82, 191-208 (1974)

SHABAD, L.M., KOLESNICHENKO, T.S. and NIKONOVA, T.V.: The effect of transplacental administration of DDT on organ cultures of foetal mouse lung tissue. Int.J.Cancer 9, 365-373 (1972)

STÖCKLE, G.: Quantitative enzymhistochemische Analyse der DÄNA Carcinogenese in Abhängigkeit der Cytochrom P450 Funktion. Diss. Universität Tübingen (1978)

TOMATIS, L., TURUSOV, V., DAY, N. and CHARLES, R.T.: The effect of long-term exposure to DDT on CF-1 mice. Int.J.Cancer 10, 489-506 (1972)

TOMATIS, L., TURUSOV, V., CHARLES, R.T., BOIOCCHI, M. and GATI, E.: Liver tumors in CF-1 mice exposed for limited periods of technical DDT. Z.Krebsforsch. 82, 25-35 (1974)

TURUSOV, V.S., DERINGER, M.K., DUNN, T.B. and STEWART, H.L.: Malignant mouse-liver tumors resembling human hepatoblastomas. J.Nat.Cancer Inst. 51, 1689-1695 (1973)

UEHLEKE, H., HELLMER, K.H. and TABARELLI-POPLAWSKI, S.: Metabolic activation of halothane and its covalent binding to liver endoplasmic proteins in vitro. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharm. 279, 39-52 (1973)

U.S. Department of Health, Education, And Welfare: Report of the Secretary's Commission on Pesticides and their Relationship to environmental health. 99-177. Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington (Dec. 1969)

WEBER, G., CANTERO, N.: Glucose-6-phosphatase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues. Cancer Res. 15, 105-108 (1955)

WEIBEL, E.R.: Sterological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int.Rev.Cytol. 26, 235-302 (1969)

WILKINSON, C.F.: Detoxication of pesticides and the mechanism of synergism. "Enzymatic oxidations and toxicants. In: Toxizität und therapeutische Anwendbarkeit des DDT und seiner Metaboliten, Greim, H. (Hrsg.), Ärztliche Forschung Jg. 24, Heft 7, 197-201 (1970)

YEUNG, C.Y., FIELD, C.E.: Phenobarbitone therapy in neonatal hyperbilirubinaemia. Lancet II, 135-139 (1969)

Lebenslauf

Am 29. 12. 1948 wurde ich, Johann Schuster, als Sohn des Stefan Schuster und seiner Ehefrau Maria, geb. Redlinger, in Ellwangen/Jagst geboren.

Nach Besuch der Hauptschule Hüttlingen von 1955 – 1959 wechselte ich an das Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen, wo ich 1968 das Abitur ablegte.

Zum Wintersemester 1968/69 immatrikulierte ich mich für das Fach Humanmedizin an der Universität Tübingen. Dort legte ich nach dem Sommersemester 1969 das Vorphysikum, nach dem Sommersemester 1971 das Physikum und am 22. 01. 1975 das Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistent war ich vier Monate am Kreiskrankenhaus Roding/Opf.(Chirurgie), sechs Monate am Toxikoligschen Institut der Universität Tübingen und vier Monate am Kreiskrankenhaus Trossingen (Innere Medizin) tätig. Die Approbation erhielt ich am 25. Mai 1976.

Abschließend war ich fünf Monate am Toxikologischen Institut der Universität Tübingen tätig.

Seit dem 01. Januar 1977 arbeite ich als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Anästhesiologie des Klinikums Heidelberg.

Unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Kunz arbeite ich seit April 1973 an vorliegender Arbeit.